



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ  
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ  
ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ & ΡΑΔΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ,  
ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

# Εκτίμηση ενδογενούς ακτινοευαισθησίας ασθενών υπό ακτινοθεραπεία με βάση την επαγωγή χρωματιδικών θραυσμάτων στη G2- φάση λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος

Καισαρίδη Σοφία | Αθήνα 2019

Υπεύθυνος ΕΜΠ: Αλέξανδρος Γεωργακίλας, Αν. Καθηγητής ΕΜΠ  
Υπεύθυνη ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»: Γεωργία Ι. Τερζούδη, Α' Ερευνήτρια ΕΚΕΦΕ  
«Δημόκριτος»



## *Ευχαριστίες*

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τη Δρ. Γεωργία Τερζούδη του Ινστιτούτου Υγειοφυσικής & Περιβαλλοντικής Υγιεινής ΙΠΤ-Α, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για την καθοδήγηση και τη βοήθεια στη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή, Δρ. Αλέξανδρο Γεωργακίλα, για τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές του. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Αγγελική Νικολακοπούλου που από την πρακτική εργασία έως το τέλος της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας μου προσέφερε πολύτιμη βοήθεια και εκπαίδευση στο πειραματικό μέρος. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Μυρσίνη Μακροπούλου που με βοήθησε και με κατεύθυνε πολλάκις.

## Περίληψη

Με αφορμή την αναγκαιότητα για ανάδειξη της μεγάλης σημασίας της εκτίμησης της ακτινοευαισθησίας ατόμων του πληθυσμού, στην παρούσα διπλωματική έγινε μια προσπάθεια εκτίμησης ακτινοευαισθησίας ατόμων με βάση την επαγωγή χρωματιδικών θραυσμάτων στη G<sub>2</sub> φάση λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας γίνεται μια θεωρητική ανάλυση των ιδιοτήτων των ιοντιζουσών ακτινοβολιών, των πηγών που τις παράγουν και αναφέρονται οι μονάδες μέτρησής τους. Προκειμένου να γίνει πλήρως κατανοητή η επιλογή της ανάλυσης στη G<sub>2</sub> φάση του κυτταρικού κύκλου, το θεωρητικό κομμάτι συνεχίζει με την παρουσίαση του κυτταρικού κύκλου ζωής, τη σημασία κάθε φάσης του, αλλά και με μηχανισμούς που μπορεί να τον διαταράξουν.

Στο πειραματικό μέρος, παρατίθεται το πειραματικό πρωτόκολλο και αναλυτικά η μέθοδος που ακολουθήθηκε μέχρι τη συλλογή των αποτελεσμάτων από το οπτικό μικροσκόπιο. Στην παρούσα διπλωματική μελετήθηκαν επτά υγιείς δότες και έξι καρκινοπαθείς, για τους οποίους εκτιμήθηκε η ακτινοευαισθησία τους με βάση τον Ατομικό Δείκτη Ακτινοευαισθησίας (IRS).

## Πίνακας περιεχομένων

<b>1. Ιοντίζουσα ακτινοβολία</b>	<b>1</b>
1.1 Μονάδες μέτρησης ιοντιζουσών ακτινοβολιών	1
1.2 Αλληλεπίδραση με την ύλη	3
1.3 Εξασθένιση δέσμης φωτονίων	3
1.4 Μηχανισμοί σκέδασης	5
1.5 Μηχανισμοί απορρόφησης	7
1.6 Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας και βιολογικής ύλης	11
1.7 Ερμηνεία της βιολογικής βλάβης	14
1.8 Βιολογικές επιδράσεις της ακτινοβολίας	15
<b>2. Επιδράσεις ακτινοβολίας και βιολογικά αποτελέσματα στο κύτταρο - Βιοδοσιμετρία</b>	<b>20</b>
2.1 Κατάταξη χρωμοσωμικών ανωμαλιών	23
2.2 Παράγοντες που επιδρούν στο βιολογικό αποτέλεσμα της ακτινοβολήσης	23
2.3 Καμπύλες επιβίωσης των κυττάρων	27
2.4 Ακτινοβολήση στη G <sub>0</sub> φάση του κυτταρικού κύκλου – Βιοδοσιμετρία	29
<b>3. Βιοδοσιμετρία με κυτταρογενετικές μεθόδους</b>	<b>33</b>
3.1 Η κλασική κυτταρογενετική μέθοδος βιοδοσιμετρίας	34
3.2 Μέθοδος πρόωρης χρωμοσωμικής συμπίκνωσης (PCC)	35
3.3 Μέθοδοι βιοδοσιμετρίας που βασίζονται στην ανίχνευση σταθερών χρωμοσωμικών αλλοιώσεων	35
<b>4. Ακτινοβολήση στη G<sub>2</sub> φάση του κυτταρικού κύκλου – Ακτινοευαισθησία</b>	<b>39</b>
4.1 Χρωμοσωμικές αλλοιώσεις	39
4.2 Διακύμανση της ακτινοευαισθησίας μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού και η ανάγκη εξατομίκευσης της επικινδυνότητας μιας υπερέκθεσης	39
4.3 Ανίχνευση ατόμων του πληθυσμού με αυξημένη ευαισθησία στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες	40
4.4 Μηχανισμοί ακτινοευαισθησίας στο μοριακό και κυτταρογενετικό επίπεδο	40
4.5 Σημασία καταστολής του G <sub>2</sub> /M σημείου ελέγχου	41
4.6 Σημασία μελέτης της ακτινοευαισθησίας	44
<b>5. Το μικροσκόπιο</b>	<b>46</b>
5.1 Τα μέρη του μικροσκοπίου	46
5.2 Σημαντικά μεγέθη	48
<b>6. Πειραματικό μέρος</b>	<b>50</b>
6.1 Συνθήκες ακτινοβολήσης	51
6.2 Προετοιμασία δειγμάτων αίματος	51

6.4 Προετοιμασία χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων.....	53
6.5 Ανάλυση στο οπτικό μικροσκόπιο .....	54
<b>7. Αποτελέσματα .....</b>	<b>55</b>
7.1 Αξιολόγηση επίδρασης αναστολέα του G2/M σημείου ελέγχου .....	58
7.2 Σύγκριση μεταξύ ατόμων του πληθυσμού.....	67
7.3 Έλεγχος ακτινοευαισθησίας.....	75
7.4 Η στατιστική ανάλυση .....	79
<b>8. Συζήτηση.....</b>	<b>82</b>
<b>9. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>85</b>



## 1. Ιοντίζουσα ακτινοβολία

Ιοντίζουσα ακτινοβολία ονομάζουμε την ακτινοβολία που μεταφέρει αρκετή ενέργεια, ώστε στην αλληλεπίδρασή της με την ύλη να προκαλεί ιονισμό των ατόμων αυτής. Ιοντίζουσες ακτινοβολίες για παράδειγμα θεωρούνται η  $\gamma$  και η X, πυρήνες He,  $\beta$ , νετρόνια. <sup>[37]</sup>

### 1.1 Μονάδες μέτρησης ιοντιζουσών ακτινοβολιών

- Σαν **ενέργεια** ακτινοβολίας R ορίζεται η ενέργεια των σωματιδίων που εκπέμπονται, μεταφέρονται ή προσλαμβάνονται. Η ενέργεια των εν λόγω ακτινοβολιών μετριέται σε μονάδες ηλεκτρονιοβολτ (eV), που ορίζεται ως η ενέργεια που προσλαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο όταν επιταχυνθεί μέσω διαφοράς δυναμικού 1V.

$$1 \text{ eV} = 1.602 \times 10^{-19} \text{ J}$$

- Η **ενεργότητα** μιας ραδιενεργού πηγής ορίζεται από τον αριθμό των αποδιεγέρσεων (διασπάσεων)/sec. Μονάδα μέτρησης είναι το 1 Ci (Curie).

$$1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ διασπάσεις/s}$$

- Η **δόση ιοντισμού**  $D_i$  δίνεται από τη σχέση του φορτίου Q που απελευθερώνεται λόγω της ακτινοβολίας στον αέρα με πυκνότητα  $\rho_A$ .

$$D_i = dQ/\rho_A dV$$

Μονάδα μέτρησης είναι το Roentgen (R):  $1 \text{ R} = 2.58 \times 10^{-4} \text{ C}/(\text{kg αέρα})$

- **Ενεργειακή δόση** ακτινοβολίας ορίζεται ως η ενέργεια ακτινοβολίας  $W^D$  που απορροφάται από όγκο ύλης V και πυκνότητας  $\rho$ .



$$D = dW^D/\rho dV$$

Μονάδα μέτρησης της δόσης είναι:  $1 \text{ rad} = 100 \text{ erg/gr} = 10^{-2} \text{ J/kg}$  και  $1 \text{ gr} = 1 \text{ J/kg}$

- **Ισοδύναμη δόση**  $D_q$  είναι το μέτρο της επίδρασης των ιοντιζουσών ακτινοβολιών επάνω στο ανθρώπινο σώμα. Ορίζεται από τη σχέση:

$$D_q = qD$$

όπου  $q$  είναι ο ποιοτικός παράγοντας της βιολογικής επίδρασης των διαφορετικών τύπων των ιοντιζουσών ακτινοβολιών επάνω στο βιολογικό σύστημα. Η μονάδα μέτρησης είναι το rem

$$1 \text{ rem} = q \cdot 1 \text{ rad} \text{ και } 1 \text{ Sv} = 100 \text{ rem}$$

Ο ποιοτικός παράγοντας έχει τις ίδιες περίπου τιμές  $q = 1$  για ακτίνες  $\gamma$  και ηλεκτρόνια,  $q = 10$  για σωματίδια  $\alpha$ , πρωτόνια και δευτέρια,  $q = 20$  για βαρείς πυρήνες και  $2 < q < 10$  για νετρόνια, ανάλογα με την κινητική τους ενέργεια. <sup>[41]</sup>

Φυσική Ποσότητα	S.I. μονάδα	Ευρέως χρησιμοποιούμενη μονάδα	Σχέσεις
Ενεργότητα	Becquerel (Bq) $1 \text{ Bq} = 1$ διάσπαση/sec	Curie (Ci)	$1 \text{ Bq} = 27 \text{ pCi}$ $1 \text{ Ci} = 37 \text{ GBq}$
Ενεργειακή δόση	Gray (Gy) $1 \text{ gr} = 1 \text{ J/kg}$	Rad	$1 \text{ Gy} = 100 \text{ rads}$ $1 \text{ rad} = 0.01 \text{ Gy}$
Ισοδύναμη δόση	Sievert (Sv) $1 \text{ Sv} = 1 \text{ J/kg}$	Rem	$1 \text{ Sv} = 100 \text{ rems}$ $1 \text{ rem} = 0.01 \text{ Sv}$
Δόση Ιοντισμού (έκθεση)	Coulomb/ kg αέρα (Cb/kg)	Roentgen (R)	$1 \text{ Cb/kg} = 3.76 \text{ R}$ $1 \text{ R} = 2.58 \times 10^4 \text{ Cb/kg}$

Πίνακας 1.1.1: Συνοπτικά οι μονάδες μέτρησης ιοντιζουσών ακτινοβολιών

Ακτινοβολία	Μάζα (amu)	Φορτίο	Προστατευτικό μέσο
$\alpha$	4	+2	Χαρτί, δέρμα, ρούχα
$\beta$	$1/1840$	$\pm 1$	Πλαστικό, ελαφρά μέταλλα
$\gamma$	0	0	Πυκνά μέσα, μπετόν, γη
Νετρόνια	1	0	Νερό, μπετόν, λάδι, πολυαιθυλένιο

Πίνακας 1.1.2: Διείσδυση ιοντιζουσών ακτινοβολιών μέσα στην

## 1.2 Αλληλεπίδραση με την ύλη

Σχετικά με την αλληλεπίδραση φωτονίων ( $\gamma$ , X) με την ύλη υπάρχουν δύο περιπτώσεις: η απορρόφησή του φωτονίου ή η σκέδασή του, η απόκλιση, δηλαδή, της αρχικής τους πορείας. Ανεξαρτήτως από τον τρόπο αλληλεπίδρασης, το αρχικό φωτόνιο χάνει μέρος της ενέργειας που είχε, άρα έχουμε εξασθένιση της δέσμης φωτονίων. [37]

## 1.3 Εξασθένιση δέσμης φωτονίων

Σημαντικό παράγοντα για το φαινόμενο της εξασθένισης αποτελεί η ενεργός διατομή, γι' αυτό και την ορίζουμε. Θεωρούμε ενεργό επιφάνεια του στόχου (λεπτού υμενίου) με αριθμό ατόμων  $\alpha$  ανά μονάδα όγκου με πάχος  $dx$ . Τότε η εξασθένιση της δέσμης που διέρχεται από την ύλη είναι:

$$\frac{dN}{N} = -\sigma \alpha dx$$

όπου  $N$  ο αριθμός των φωτονίων της αρχικής δέσμης,  $\alpha dx$  ο αριθμός των ατόμων ανά μονάδα επιφάνειας και  $\sigma$  η ενεργός διατομή της εξασθένησης των φωτονίων. Μονάδα μέτρησης της ενεργού διατομής είναι το  $Barn$  ( $10^{-28} m^2$ ). Για να πάρουμε τη σχέση για όλο το πάχος της ύλης ολοκληρώνουμε από μηδέν έως  $x$  (το πάχος της ύλης) και έχουμε:

$$\int_0^x \frac{dN}{N} = - \int_0^x \sigma \alpha dx \Rightarrow N = N_0 e^{-\sigma \alpha x}$$

η οποία αποτελεί την χαρακτηριστική σχέση εκθετικής εξασθένησης των ακτίνων από παράλληλη δέσμη που εισέρχεται μέσα σε λεπτό φύλλο. Η ποσότητα  $\Sigma = \sigma \alpha$  αποτελεί την μακροσκοπική ενεργό διατομή που είναι το άθροισμα των επιμέρους ενεργών διατομών των διαφόρων μηχανισμών απορρόφησης και σκέδασης.

Η εξασθένηση της δέσμης φωτονίων μπορεί, επίσης, να δοθεί και από τη σχέση:

$$I = I_0 e^{-\mu x}$$

που δίνει την ένταση της αρχικής δέσμης  $I_0$  μετά τη διέλευσή της από υλικό πάχους  $x$  και συντελεστή γραμμικής εξασθένησης  $\mu$ .

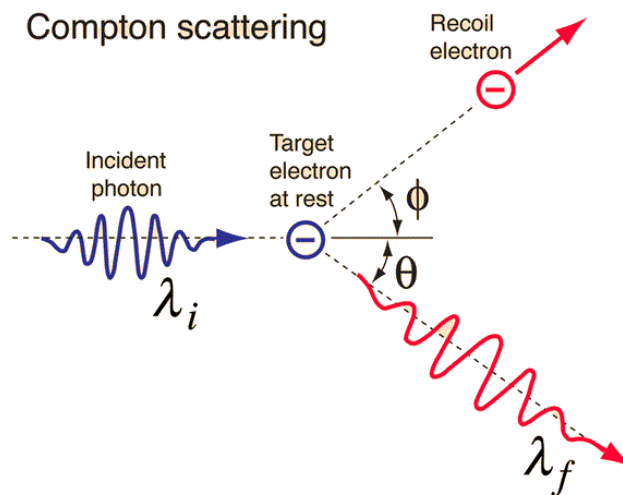
Η παράμετρος που χρησιμοποιείται συνήθως στις εφαρμογές για τον προσδιορισμό της ικανότητας εξασθένησης από ένα υλικό μιας δέσμης φωτονίων καθορισμένης ενέργειας, ονομάζεται πάχος υποδιπλασιασμού HVL και ορίζεται ως το πάχος του υλικού από το οποίο διέρχεται η δέσμη υψωμένο στο  $\frac{1}{2}$  της αρχικής του τιμής. Μεταξύ αυτού και του συντελεστή γραμμικής εξασθένησης ισχύει η σχέση:

$$\mu = \frac{0,693}{HVL}$$

## 1.4 Μηχανισμοί σκέδασης

- **Φαινόμενο Compton**

Η σκέδαση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μικρού μήκους κύματος  $\lambda$  (πχ ακτίνες X) πάνω σε ελεύθερα ή ασθενώς δέσμια ηλεκτρόνια, που συνοδεύεται από αύξηση του μήκους κύματος της, ονομάζεται σκέδαση Compton. Όσο μεγαλύτερη είναι η γωνία σκέδασης  $\theta$ , τόσο μεγαλύτερη είναι η αύξηση του μήκους κύματος. <sup>[40][41]</sup>



Εικόνα 1.4.1 Σκέδαση Compton

Το φωτόνιο με αρχική ενέργεια  $hf$  χάνει ενέργεια όταν συγκρούεται με το ηλεκτρόνιο στόχο και έχουμε παραγωγή ενός δευτερογενούς φωτονίου ενέργειας  $hf'$  που σκεδάζεται υπό γωνία  $\theta$  και το εκτρεπόμενο ηλεκτρόνιο υπό γωνία  $\phi$  που αποκτά κινητική ενέργεια  $hf-hf'$ . Η  $\theta$  ονομάζεται γωνία σκέδασης Compton.

Από τις αρχές διατήρησης της ενέργειας και της ορμής για το σύστημα αυτό υπολογίζουμε την ενέργεια του δευτερογενούς φωτονίου ως:

$$hf' = \frac{hf}{1 + \frac{hf}{m_0c^2}(1 - \sin \theta)}$$

Για τις γωνίες ισχύει:

$$\tan \frac{\theta}{2} = \frac{\cos \varphi}{1 - \frac{hf}{m_0 c^2}}$$

Από τη σχέση αυτή και την  $\lambda = c/f$  προκύπτει η διαφορά στο μήκος κύματος  $\Delta\lambda$  μεταξύ του αρχικού και του δευτερογενούς φωτονίου:

$$\Delta\lambda = \lambda' - \lambda = \frac{h}{m_0 c^2} (1 - \cos \theta) = \lambda_0 (1 - \cos \theta)$$

Το  $\lambda_0$  είναι το  $\frac{h}{m_0 c}$  και είναι ίσο με 0,0242 Å που ονομάζεται μήκος κύματος Compton και παριστά τη μεταβολή στο μήκος κύματος του φωτονίου για γωνία σκέδασης  $\theta=90^\circ$ . Η μέγιστη μεταβολή στο μήκος κύματος αντιστοιχεί στην ελάχιστη ενέργεια φωτονίου και είναι ίση με  $2\lambda_0$ , συμβαίνει για γωνία  $\theta=180^\circ$  και ονομάζεται οπισθοσκέδαση. <sup>[40][41]</sup>

- **Σκέδαση Thomson και Rayleigh** <sup>[40][41]</sup>

Στην κλασική έννοια του φωτονίου στο οποίο αυτό φαίνεται να χάνει τη σωματιδιακή του υπόσταση, το ηλεκτρόνιο του ατόμου με το οποίο αλληλεπιδρά, πάλλεται σα δίπολο επανεκπομπής της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας του φωτονίου, χωρίς μεταβολή της συχνότητας. Σ' αυτήν την περίπτωση η σκέδαση ονομάζεται σκέδαση Thomson και η ολική ενεργός διατομή έχει σταθερή τιμή

$$\sigma_{Th} = 0.665 \text{ barn}$$

Στις χαμηλές ενέργειες των φωτονίων, τα ηλεκτρόνια συμπεριφέρονται σαν δίπολα όλα μαζί, δηλαδή εκπέμπουν την ηλεκτρομαγνητική ενέργεια εν συμφωνία, χωρίς απώλεια ενέργειας, αλλά με μεταβολή της κατεύθυνσης του φωτονίου, δηλαδή σκέδαση κατά μια μικρή γωνία. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται σκέδαση Rayleigh. Για επαρκώς μικρές ενέργειες φωτονίων η ενεργός διατομή έχει σταθερή τιμή:

$$\sigma_{\text{coh}} = Z^2 \sigma_{\text{Th}}$$

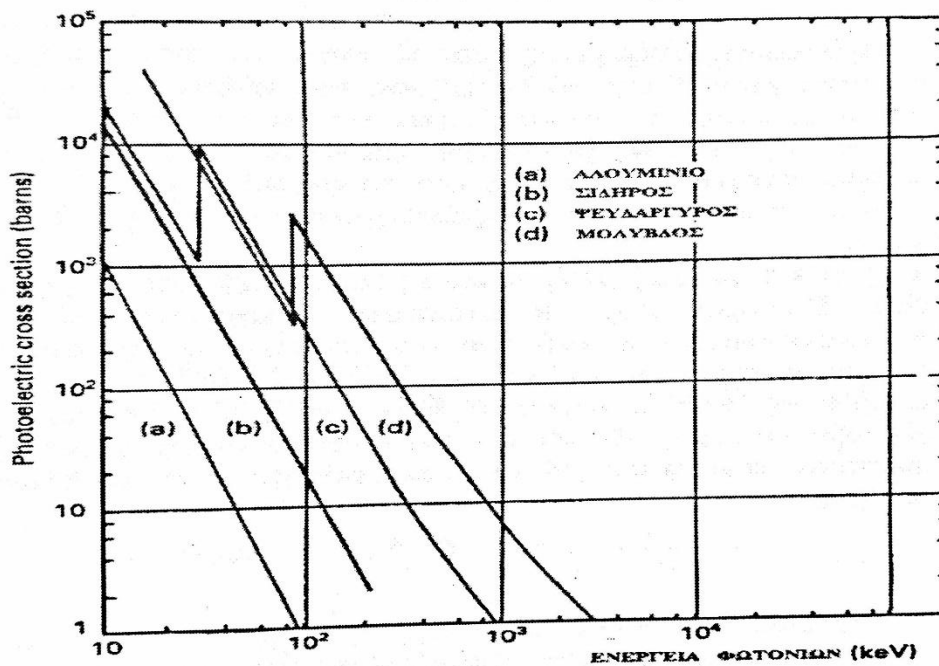
Σε υψηλότερες ενέργειες

$$\sigma_{\text{coh}} \propto \frac{1}{(h\nu)^2}$$

## 1.5 Μηχανισμοί απορρόφησης

- **Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο**

Φωτοηλεκτρικό ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο από την πρόσπτωση ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας στην επιφάνεια ενός μετάλλου, εκπέμπεται ηλεκτρόνιο. Το φαινόμενο δύναται να συμβεί αν η ενέργεια του εισερχόμενου φωτονίου είναι αρκετή ώστε να υπερνικήσει την ενέργεια σύνδεσης του ηλεκτρονίου. Η απαραίτητη αυτή προϋπόθεση προκαλεί στο γράφημα της ενεργού διατομής σε συνάρτηση της ενέργειας των φωτονίων βυθίσματα απορρόφησης.



Εικόνα 1.5.1 Διάγραμμα ενεργούς διατομής συναρτήσει της ενέργειας φωτονίων  
 Πηγή: «Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες, Εφαρμογές στη Βιολογία και Ιατρική» Ε. Ν. Γαζής,  
 Αθήνα 2002

Τα βυθίσματα αυτά ερμηνεύονται με την εισαγωγή της έννοιας της ισχύος του ταλαντωτή που εξαρτάται από την ενέργεια φωτονίου  $E_\gamma$  και τον ατομικό αριθμό  $Z$  και εκφράζεται από τη σχέση

$$\tau \propto Z^\alpha E_\gamma^{-\beta}, \quad 4 < \alpha < 5, \quad \beta \approx 3$$

Παρατηρείται έντονη εξάρτηση από τον ατομικό αριθμό, γεγονός το οποίο συνεπάγεται αύξηση της ισχύος του ταλαντωτή για δεδομένη συχνότητα ταλάντωσης καθώς αυξάνεται το  $Z$  και αντίστροφη εξάρτηση της ενέργειας του φωτονίου.

Η ανωτέρω φωτοηλεκτρική διαδικασία σχετίζεται με τη σκέδαση ακτίνων  $\gamma$ , των οποίων η σκέδαση οφείλεται στους ταλαντωτές και η σκεδαζόμενη ακτινοβολία είναι σύμφωνη με την ακτινοβολία Rayleigh. Καθώς η ακτινοβολία διέρχεται από την ύλη και σκεδάζεται, η φάση της μεταβάλλεται από μηδέν έως  $\pi$  ακτίνια, εισάγοντας μια ανωμαλία στο πλάτος της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ακριβώς στην έναρξη του βυθίσματος απορρόφησης.

Τα βυθίσματα απορρόφησης παρατηρούνται στις τιμές της ενέργειας των φωτονίων που συμπίπτουν με την ενέργεια σύνδεσης των ηλεκτρονίων στους αντίστοιχους ενεργειακούς φλοιούς.

Η ενεργός διατομή του φωτοηλεκτρικού φαινομένου αποδίδεται κατά προσέγγιση για χαμηλές ενέργειες φωτονίων από την αναλογία

$$\sigma_{pe} \propto \frac{Z^4}{(h\nu)^3}$$

Το κενό στον ηλεκτρονικό φλοιό που δημιουργείται από την έξοδο του ηλεκτρονίου από το άτομο συμπληρώνεται από το ηλεκτρόνιο εσωτερικού φλοιού και συνοδεύεται από εκπομπή ακτινοβολίας φθορισμού ή εκπομπή ηλεκτρονίου Auger. <sup>[40][41]</sup>

### • Δίδυμη γένεση

Στην περίπτωση που η ενέργεια των φωτονίων υπερβαίνει κάποια δεδομένη τιμή, είναι δυνατόν να συμβούν και άλλα φαινόμενα πέραν των προηγούμενων. Συγκεκριμένα, για ενέργειες φωτονίων που ξεπερνούν την τιμή των 1.02 MeV (διπλάσια της μάζας ηρεμίας του ηλεκτρονίου) εμφανίζεται το φαινόμενο της δίδυμης γένεσης, κατά την οποία όλη η ενέργεια του φωτονίου υλοποιείται στο πεδίο του πυρήνα και δημιουργεί ένα θετικό (ποζιτρόνιο) και ένα αρνητικό ηλεκτρόνιο. Το πλεόνασμα ενέργειας που εμφανίζεται μοιράζεται σαν κινητική ενέργεια μεταξύ των δύο σωματιδίων οποιοδήποτε σε ποσοστό μεταξύ τους.

$$h\nu = 1.02 + KE^+ + KE^-$$

Για τη διατήρηση της ορμής των δύο σωματιδίων απαιτείται η παρουσία ενός πρόσθετου σώματος που δεν είναι άλλο από τον πυρήνα. Για το λόγο αυτό η ενεργός διατομή αυξάνεται ανάλογα με τον ατομικό αριθμό του πυρήνα. Συγκεκριμένα ισχύει:

$$\sigma_{pp} \propto \ln(h\nu) Z^2, \text{ για μικρό } Z$$

$$\sigma_{pp} \propto \ln(h\nu) Z^2, \text{ για μεγάλο } Z$$

Οι νόμοι που διέπουν τις κατευθύνσεις και την ενέργεια των σωματιδίων μετά τη δημιουργία τους είναι συνοπτικά:

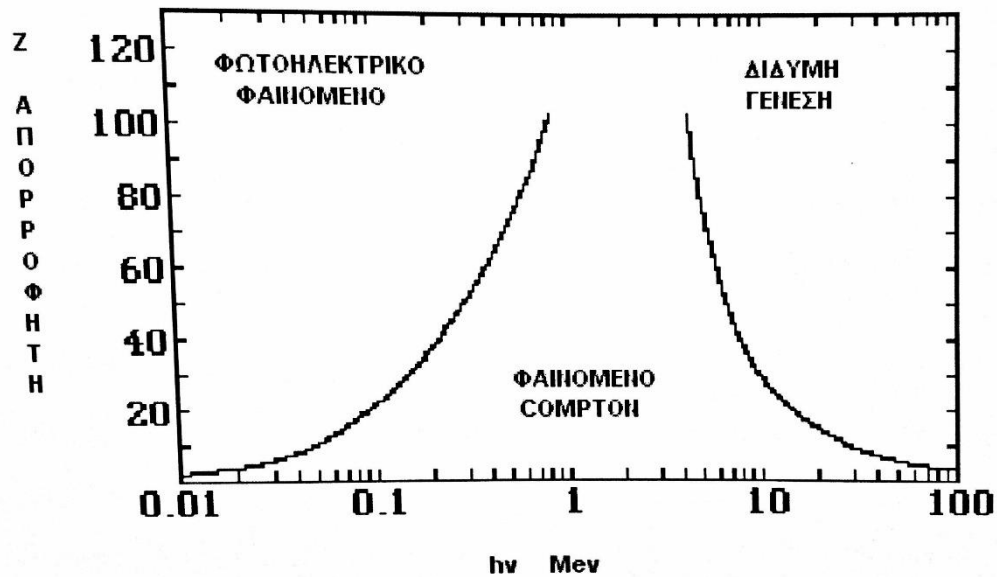
A. Η κινητική ενέργεια κατανέμεται μεταξύ των δύο σωματιδίων εκθετικά

B. Και τα δύο σωματίδια εκπέμπονται προς την κατεύθυνση που είχε το αρχικό φωτόνιο. Η κατανομή των γωνιών  $\phi^-$  και  $\phi^+$  ακολουθεί εκθετικό νόμο.

Γ. Δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των γωνιών σκεδάσεως των δύο σωματιδίων. Μετά την παραγωγή τους τα σωματίδια οδεύουν μέσα στην ύλη χάνοντας την κινητική τους ενέργεια με ιονισμούς.



Η σχετική συνεισφορά μεταξύ των τριών σημαντικότερων διαδικασιών αλληλεπίδρασης των ακτίνων  $\gamma$  και  $X$  με την ύλη, της φωτοηλεκτρικής διαδικασίας, του φαινομένου Compton και της δίδυμης γένεσης παρουσιάζονται χαρακτηριστικά στην επόμενη εικόνα. <sup>[40][41]</sup>



Εικόνα 1.5.2 Σχετική συνεισφορά μεταξύ των τριών σημαντικότερων διαδικασιών αλληλεπίδρασης των ακτίνων  $\gamma$  και  $X$  με την ύλη, της φωτοηλεκτρικής διαδικασίας, του φαινομένου Compton και της δίδυμης γένεσης  
 Πηγή: «Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες, Εφαρμογές στη Βιολογία και Ιατρική» Ε. Ν. Γαζής, Αθήνα 2002

## 1.6 Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας και βιολογικής ύλης

Η ακτινοβολήση οποιουδήποτε βιολογικού υλικού προκαλεί μια αλληλουχία διαδικασιών με μεγάλες διαφορές στην κλίμακα του χρόνου εμφανίσεώς τους. Γενικά, όμως, η αλληλεπίδραση του βιολογικού υλικού με ιοντίζουσα ακτινοβολία χωρίζεται σε τρία στάδια: το φυσικό, το χημικό και το βιολογικό.

- **Το φυσικό στάδιο**

Πρόκειται για το στάδιο κατά το οποίο η ιοντίζουσα ακτινοβολία διερχόμενη από την ύλη (ιστό) αποδίδει ενέργεια μέσω ιονισμών και αποδιεγέρσεων. Η μεταφορά ενέργειας γίνεται σε χρόνο μικρότερο των  $10^{-18}$ s, αλλά η κατανομή της στο χώρο εξαρτάται από το είδος της ενέργειας της ακτινοβολίας.

Αν η τιμή της LET (Linear Energy Transfer-LET =  $dE/dx$ ) είναι χαμηλή τότε η ακτινοβολία (π.χ. φωτόνια ή ηλεκτρόνια ηλεκτρόνια) προκαλεί μικρό αριθμό ιονισμών και διεγέρσεων ανά μm διαδρομής. Αντιθέτως για ακτινοβολίες με υψηλή LET (σωματίδια α, πρωτόνια ή βαρέα ιόντα) παρατηρούνται πυκνοί ιονισμοί ανά μm διαδρομής. Η ενέργεια που μεταφέρεται σε ένα μικρού όγκου βιολογικό υλικό, δεν είναι η ίδια για όλους τους στόχους και τα μόρια που το αποτελούν. Η μέση τιμή της ενέργειας που μεταφέρεται στο βιολογικό υλικό είναι η απορροφούμενη δόση. Το αποτέλεσμα που θα προκληθεί στο στόχο εξαρτάται από το μέγεθος της απορροφούμενης δόσης και από την κατανομή της.<sup>[33]</sup>

- **Το χημικό στάδιο**

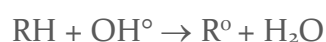
Στο στάδιο αυτό που ακολουθεί το φυσικό, κατά το οποίο τα άτομα του βιολογικού υλικού ακτινοβολήθηκαν, τα συστατικά των κυττάρων αντιδρούν με ταχείες χημικές αντιδράσεις. Η απορρόφηση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας από τα βιολογικά υλικά δημιουργεί ιονισμούς και διεγέρσεις με αποτέλεσμα τη δημιουργία ορισμένων σχηματισμών που ονομάζονται ελεύθερες ρίζες. Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια ηλεκτρικά ουδέτερα, με ίσους αριθμούς πρωτονίων και ηλεκτρονίων, αλλά ένα ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στιβάδας δεν σχηματίζει ζεύγος (ασύζευκτο ηλεκτρόνιο ηλεκτρόνιο), με αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες να είναι εξαιρετικά χημικώς δραστικές. Επειδή το μόριο που κυριαρχεί ποσοτικά στα βιολογικά υλικά είναι αυτό του ύδατος, είναι αυτό που κυρίως δέχεται την επίδραση της ακτινοβολίας<sup>[4]</sup>. Η επίδραση της ακτινοβολίας

με το νερό είναι μια διαδικασία γνωστή ως ραδιόλυση και τα τρία βασικά της προϊόντα είναι το υδρογονομένο ηλεκτρόνιο, το OH και το H.

Συνοπτικά, η ραδιόλυση του ύδατος περιγράφεται από την εξίσωση:



Οι ελεύθερες ρίζες OH<sup>°</sup>, είναι ασταθείς και εξαιρετικά δραστικές, γι' αυτό και η εμβέλεια τους είναι μικρότερη από 100 Angstrom. Εάν ένα οργανικό μόριο, RH (π.χ. DNA), βρεθεί μέσα στην τροχιά των ελευθέρων ριζών, θα συμβούν αντιδράσεις της μορφής:



θα παραχθούν, δηλαδή, οργανικές ρίζες R<sup>°</sup>, που ως ασταθείς και με υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο, θα μετασχηματιστούν γρήγορα προκαλώντας μεταβολή-βλάβη στη δομή του οργανικού μορίου.<sup>[11]</sup>

Οι βλάβες των κυττάρων που οφείλονται σε απευθείας ιονισμό των ατόμων, τα οποία και υφίστανται χημική μεταβολή, ονομάζονται «άμεσος δράση», ενώ οι βλάβες που οφείλονται στη δράση των ελευθέρων ριζών αναφέρονται ως «έμμεσος δράση».<sup>[33]</sup>

## • Το βιολογικό στάδιο

Αμέσως μετά το χημικό στάδιο αρχίζει η εμφάνιση ενζυμικών μηχανισμών που δρουν επιδιορθωτικά στους μοριακούς σχηματισμούς που υπέστησαν βλάβη. Βλάβες στο DNA μπορεί να είναι γενικά:

- «Τυπογραφικά» λάθη της πολυμεράσης κατά την αντιγραφή (προσθήκη ή απάλειψη 1-4 βάσεων ή εισδοχή μη συμπληρωματικής βάσης)
- Αλλοιώσεις βάσεων (οξειδώσεις, μεθυλιώσεις, αποπυρηνώσεις, απομινώσεις)
- Θραύση μιας αλυσίδας του DNA (ssb)
- Προσθήκη ογκωδών χημικών μορίων
- Θραύση και των δύο αλυσίδων του DNA (dsb)

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία αποτελεί μεταλλαξογόνο παράγοντα. Οι βλάβες βάσεων και οι SSB επιδιορθώνονται στο μεγαλύτερο ποσοστό τους. Σε περίπτωση

ανεπιτυχούς επιδιόρθωσης όμως μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγή στην αλληλουχία των βάσεων του γενετικού υλικού και συνεπώς. Οι DSB επιδιορθώνονται δυσκολότερα. Μη επιδιορθωμένες DSB, εκτός από χρωμοσωμικές ανωμαλίες, μπορούν να οδηγήσουν επίσης σε μετάλλαξη λόγω ελλείμματος βάσεων εάν τμήμα του DNA δεν επανασυνδεθεί και παραμένει ελεύθερο.

Το αποτέλεσμα των μεταλλάξεων ως γνωστόν ποικίλει και μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση μιας τροποποιημένης πρωτεΐνης και την αύξηση ή μείωση των επιπέδων μιας φυσιολογικής πρωτεΐνης. Τα στοχαστικά αποτελέσματα της ακτινοβολίας οφείλονται σε μεταλλάξεις. Η συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων αυξάνει με τη δόση ακτινοβολίας αν και σε μεγάλες δόσεις κυριαρχεί ο κυτταρικός θάνατος, οπότε ο αριθμός των μεταλλαγμένων κυττάρων μειώνεται.

Πέραν των μεταλλάξεων, μη επιτυχώς επιδιορθωμένες DSB λόγω της έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία, μπορεί να οδηγήσουν σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες που θα καταστούν εμφανείς στην επόμενη διαίρεση του κυττάρου, στη φάση της μετάφασης. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν μια ποικιλία ανταλλαγών των θραυσμάτων του DNA μεταξύ διαφορετικών χρωμοσωμάτων, μεταξύ των χρωματίδων του ίδιου χρωμοσώματος ή ακόμα και μεταξύ περιοχών της ίδιας χρωματίδας. Διακρίνονται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες και χρωματιδικές ανωμαλίες ανάλογα με το εάν η βλάβη συνέβη κατά τη G<sub>1</sub> φάση ή τη G<sub>2</sub> φάση, αντίστοιχα (βλάβη κατά την S φάση ή τη μίτωση μπορεί να οδηγήσει και στα δύο είδη). Η εμφάνιση άτυπων χρωμοσωμάτων σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο.

Η ποσοτικοποίηση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος στην πρώτη μετάφαση μετά την ακτινοβόληση αποτελεί μέθοδο βιολογικής δοσιμετρίας. Η ποσοτικοποίηση των χρωματιδικών θραυσμάτων στην πρώτη μετάφαση μετά από *in vitro* ακτινοβόληση λεμφοκυττάρων στη G<sub>2</sub> φάση του κυτταρικού κύκλου, χρησιμοποιείται ως μέθοδος ανίχνευσης αυξημένης ακτινοευαισθησίας σε άτομα του πληθυσμού.<sup>[16]</sup>  
[17][18][20][25][32][37]

Οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί αναγνωρίζουν τις βλάβες και τις επιδιορθώνουν χρησιμοποιώντας ως «καλούπι» τη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA. Τύποι επιδιορθώσεων είναι:

- ✓ Mismatch repair (MMR): διόρθωση σφαλμάτων κατά την αντιγραφή που οδηγούν σε εισαγωγή μιας ή λίγων (2-4) βάσεων λανθασμένα
- ✓ Base excision repair (BER): διόρθωση αλλοιώσεων μιας μόνο βάσης και ssb
- ✓ Nucleotide excision repair (NER): διόρθωση αλλοιώσεων που εκτείνονται σε δύο ή περισσότερα νουκλεοτίδια και προσθήκης ογκωδών μορίων

Η διαδικασία της επιδιόρθωσης διαρκεί κατά το κύριο μέρος της από 15min-3h και ολοκληρώνεται σε 24-48 περίπου ώρες. Στην περίπτωση όπου η βλάβη είναι αδύνατον να επιδιορθωθεί, τα κύτταρα οδηγούνται σε είτε στη δημιουργία μεταλλάξεων ή/και κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης (apoptosis). <sup>[4] [33]</sup>

## 1.7 Ερμηνεία της βιολογικής βλάβης

- Θεωρία της άμεσης δράσης της ακτινοβολίας

Σύμφωνα με αυτήν τη θεωρία, η ακτινοβόληση του βιολογικού υλικού προκαλεί απευθείας ιονισμό σε βιολογικά μόρια και προκαλεί την καταστροφή τους. Η θεωρία αυτή οδήγησε στη διατύπωση της θεωρίας του στόχου.

- Θεωρία της έμμεσης δράσης της ακτινοβολίας (Θεωρία ελεύθερων ριζών)

Κατά τη θεωρία αυτήν, η ακτινοβολία του βιολογικού υλικού (αποτελούμενο κατά 70% από νερό) επάγει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, οι οποίες προκαλούν βλάβες στα βιολογικά μόρια.

- Θεωρία του στόχου (Target theory)

Σύμφωνα με τη δεδομένη θεωρία, ένα απλό γεγονός («πλήξη») καταστροφής ενός ευαίσθητου στόχου στο κύτταρο επιφέρει θάνατο του κυττάρου (άμεση δράση). Ως «στόχος» ορίζεται ένα μόριο και ως «πλήξη» η πρόκληση ιονισμού στο μόριο-στόχο ή σε μια περιοχή γύρω από αυτόν, απ' όπου η ενέργεια ιονισμού μπορεί να μεταφερθεί σε αυτόν.

Η θεωρία των στόχων δέχεται και άλλες δύο αρχές, αυτήν των πολλαπλών στόχων (multitarget) και την αρχή των πολλαπλών πλήξεων (multihit), σύμφωνα με τις οποίες για να υποστεί βλάβη μια κυτταρική λειτουργία απαιτείται αδρανοποίηση πολλών στόχων και για να αδρανοποιηθεί ένας στόχος απαιτούνται πολλές, πλήξεις αντίστοιχα.

## 1.8 Βιολογικές επιδράσεις της ακτινοβολίας

### 1.8.1 Επίδραση σε κυτταρικό επίπεδο

Σκοπός της μελέτης των βιολογικών επιδράσεων της ακτινοβολίας είναι ο εντοπισμός θέσεων ή οργανιδίων στο κύτταρο, η βλάβη των οποίων μπορεί να εξηγήσει τις παρατηρούμενες επιδράσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Ο πυρήνας, κέντρο ελέγχου και συντονισμού των κυτταρικών λειτουργιών, θεωρείται πιο ευαίσθητος στην επίδραση της ακτινοβολίας συγκριτικά με το κυτταρόπλασμα και τα άλλα όργανα του κυττάρου.

Οι μορφολογικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται στους πυρήνες ακτινοβολημένων κυττάρων είναι οι εξής:

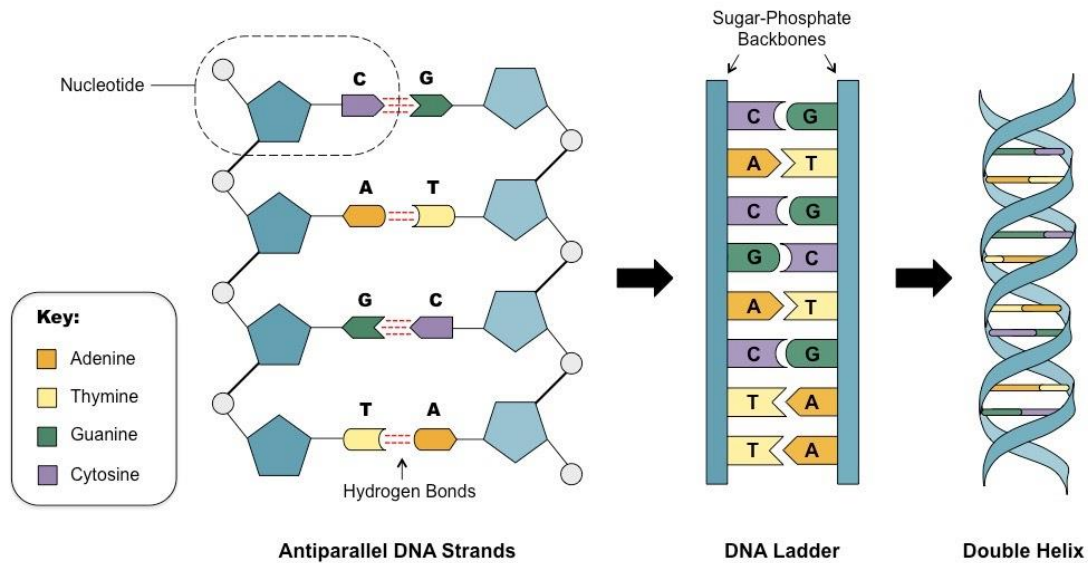
A) Πύκνωση του πυρήνα, οπότε παίρνει σφαιρικό σχήμα, το μέγεθός του ελαττώνεται, η χρωματίνη συμπυκνώνεται και διαλύεται τοπικά σε μερικές περιοχές.

B) Καρρυορυξία, κατά την οποία παρατηρείται διάσπαση του πυρήνα σε μεγάλο αριθμό ενδοκυτταρικών τεμαχιδίων.

Γ) Καρυόλυση, όπου ο πυρήνας και η χρωματίνη χάνουν την ιδιότητα να βάφονται με ειδικές χρωστικές και δεν είναι ορατά πλέον με το μικροσκοπικό παρασκεύασμα. Η καρυόλυση ακολουθεί την πύκνωση του πυρήνα.

### 1.8.2 Επίδραση στο DNA

Το DNA βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου με τη μορφή διπλής έλικας και αποτελεί το πλέον ακτινοευαίσθητο συστατικό των κυττάρων. Σύμφωνα με το μοντέλο των Watson και Crick το DNA αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες αντίθετων κατευθύνσεων, οι οποίες συγκροτούνται μεταξύ τους με ζεύγη βάσεων. Η διπλή, δεξιόστροφη έλικα έχει έναν σταθερό σκελετό από επαναλαμβανόμενα μόρια φωσφορικών ομάδων-σακχάρων που ενώνονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Οι αζωτούχες βάσεις της μιας αλυσίδας συνδέονται με αυτές της άλλης με δεσμούς υδρογόνου και με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας, δηλαδή η αδενίνη (A) συνδέεται μόνο με θυμίνη (T) και η γουανίνη (G) συνδέεται μόνο με κυτοσίνη (C) και αντιστρόφως.



Εικόνα 1.8.2.1 Αριστερά: Ακολουθία νουκλεοτιδίων σε αντιπαράλληλες αλυσίδες αποτελούμενα το καθένα από πεντόζη, φωσφορική ομάδα και τη βάση. Με διακεκομμένες γραμμές μεταξύ των βάσεων σημειώνονται οι δεσμοί υδρογόνου.

Κέντρο: Η «σκάλα» DNA

Αριστερά: Διπλή έλικα DNA

Πηγή: Bioninja

Κάθε αλλαγή στο DNA, άρα και στο γενετικό κώδικα μπορεί να ερμηνεύσει τη βιολογική επίδραση των ακτινοβολιών.

Οι πιθανές βλάβες του DNA που προέρχονται από ακτινοβόληση με ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι:

1. Σπάσιμο ενός κλώνου της αλυσίδας (SSB)
2. Διπλό σπάσιμο της αλυσίδας (DSB), δηλαδή και των δύο κλώνων. Εάν η ακτινοβολία προσβάλει και τους δύο κλώνους ταυτόχρονα και μάλιστα στην ίδια θέση, τότε οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του κυττάρου δεν μπορούν να λειτουργήσουν με ακρίβεια. Τέτοιου είδους θραύσεις και ακολουθούμενες με λανθασμένη αντικατάσταση βάσεων μπορούν να οδηγήσουν με μεταλλαγές που μεταφέρονται στους απογόνους (αν γίνονται σε γενετικά κύτταρα) ή προκαλούν καρκινογένεση στο ίδιο το άτομο (αν γίνονται σε σωματικά κύτταρα).
3. Αλλοίωση μιας βάσης (οξειδώσεις, μεθυλιώσεις, αποπυρηνώσεις, απομινώσεις)
4. Απώλεια μιας βάσης (αβασικά σημεία-AP sites)
5. Σπάσιμο δεσμού υδρογόνου μεταξύ των δύο αλυσίδων
6. Εγκάρσιες συνδέσεις μεταξύ των ελίκων (crosslinks) [4]

DNA lesions	Pyrimidine dimers	DNA adducts DNA crosslinks	Base oxidation Base hydrolysis Base damage	Single strand breaks	Double strand breaks	Replication error
Common cause	UV	carcinogens	ROS, UV, high temperature	ionizing radiation	ionizing radiation ROS stalled replication forks	inherent in replication
Mechanisms of repair	NER	NER	BER	BER	HR NHEJ	MMR
Germline defect associated with cancer predisposition	XPC skin basal and squamous cell carcinoma		MUTYH colorectal cancer		HR: BRCA1/BRCA2 breast and ovarian cancer	MSH2, MLH1 colorectal and endometrial carcinoma

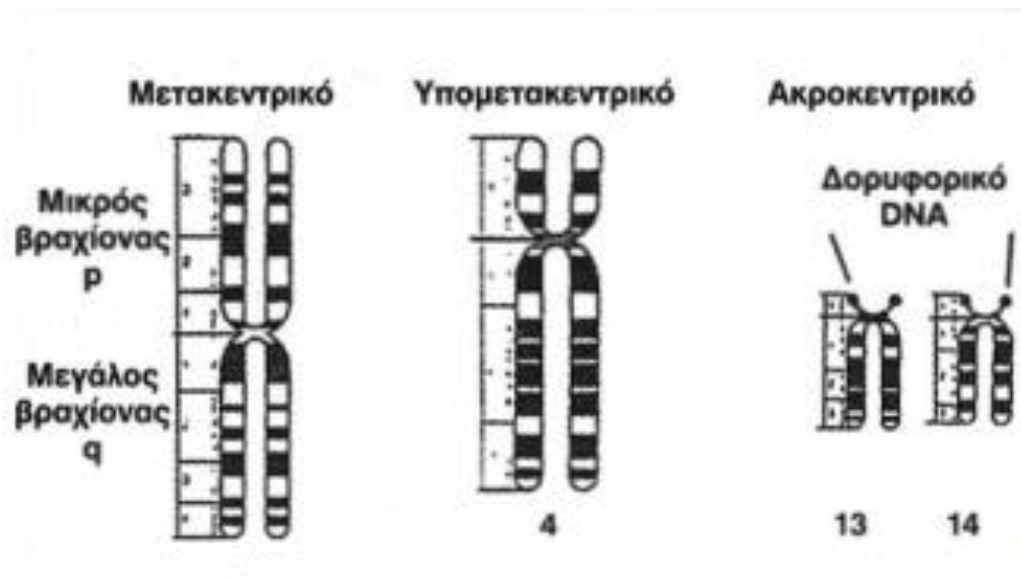
Εικόνα 1.8.2.2 Πιθανές βλάβες στο DNA λόγω ακτινοβόλησης με ιοντίζουσα ακτινοβολία  
 Πηγή: Mechanisms of DNA damage repair in adult stem cells and implications for cancer formation, Clare E. WeedenMarie-Liesse, Asselin-Labat

### 1.8.3 Επίδραση στα χρωμοσώματα

#### Μορφολογία ανθρωπίνων χρωμοσωμάτων

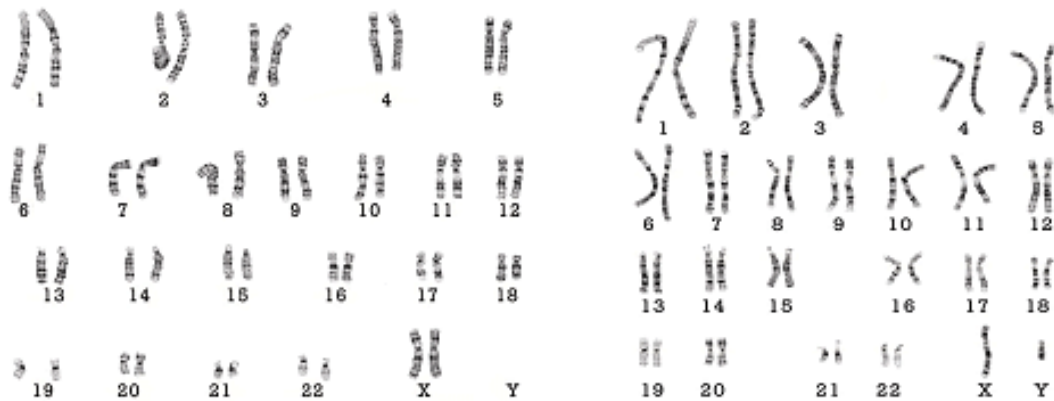
Κάθε ανθρώπινο χρωμόσωμα είναι ένα μεγάλο γραμμικό μόριο DNA και αποτελείται από σύμπλοκο χρωματίνης που έχει συμπυκνωθεί και φωσφοριωλυθεί στη μετάφραση. Κάθε μεταφασικό χρωμόσωμα αποτελείται από αδερφές χρωματίδες ενωμένες στο κεντρομερίδιο, το οποίο διαιρεί κάθε χρωματίδα σε δύο βραχίονες, έναν μικρό κι έναν μεγάλο. Τα μεταφασικά χρωμοσώματα διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος και τη θέση του κεντρομεριδίου. Όταν το κεντρομερίδιο βρίσκεται στη μέση του χρωμοσώματος, αυτό ονομάζεται μετακεντρικό. Όταν βρίσκεται εκτός του μέσου ονομάζεται υπομετακεντρικό και όταν βρίσκεται κοντά στο άκρο του ονομάζεται ακροκεντρικό.





Εικόνα 1.8.3.1 Χαρακτηρισμός χρωμοσωμάτων με βάση τη θέση του κεντρομεριδίου  
 Πηγή: Βιολογία Θετικής Κατεύθυνσης Γ' Λυκείου, ΟΕΔΒ, ebooks.edu.gr

Η ταξινόμηση των χρωμοσωμάτων ανά ζεύγη και κατά ελαττούμενο μέγεθος ονομάζεται καρυότυπος. Κάθε φυσιολογικό άτομο έχει 23 ζεύγη ομολόγων χρωμοσωμάτων στον πυρήνα των σωματικών του κυττάρων. Εξαίρεση από την ομοιομορφία των ομολόγων χρωμοσωμάτων αποτελούν τα φυλετικά (23<sup>ο</sup> ζεύγος). Τα κύτταρα των θηλυκών ατόμων του ανθρώπου έχουν δύο ομοιόμορφα φυλετικά χρωμοσώματα (XX), ενώ τα κύτταρα των αρσενικών ατόμων δύο ανόμοια φυλετικά χρωμοσώματα (XY).

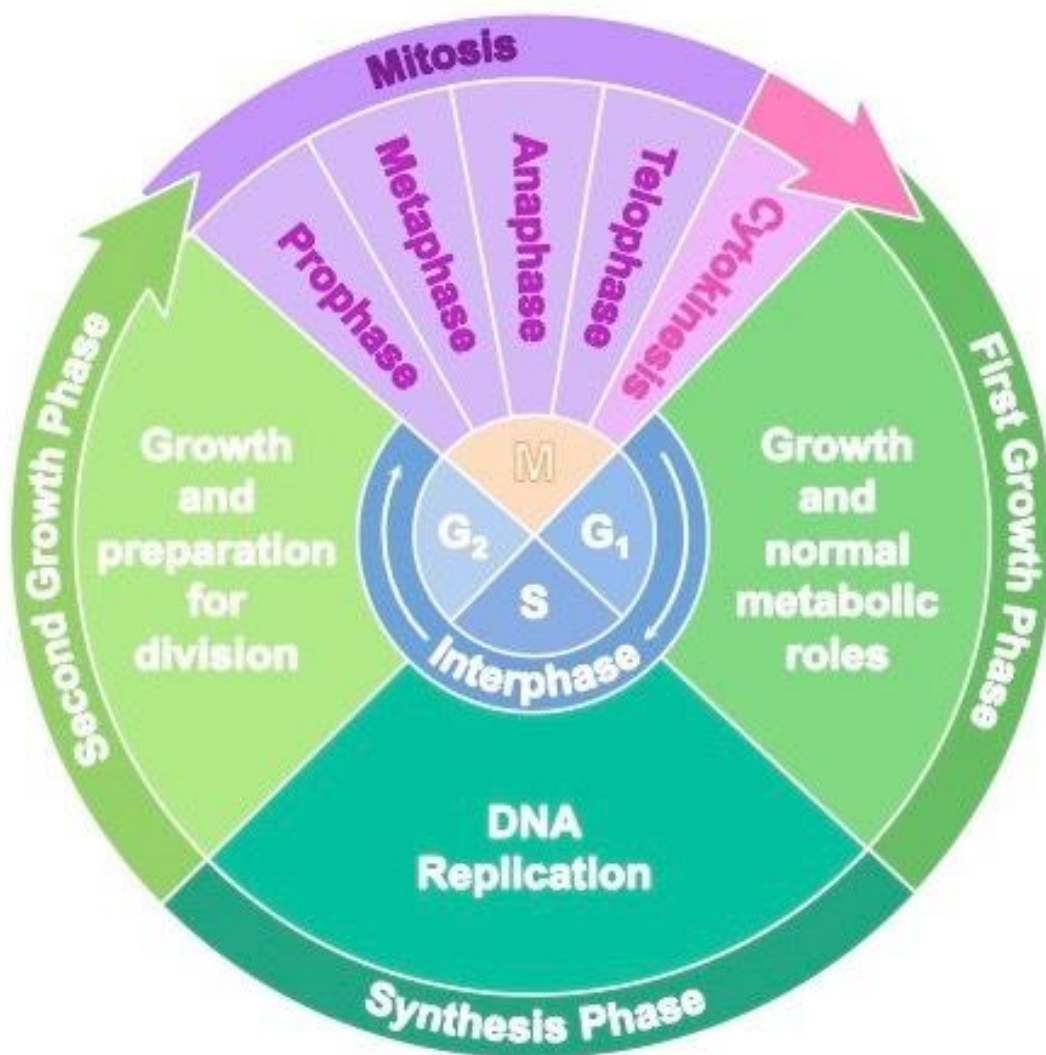


Εικόνα 1.8.3.2 Καρυότυπος γυναίκας (αριστερά) και άνδρα (δεξιά)  
 Πηγή: Cells & Heredity

Σημαντικές πληροφορίες σχετικές με τα αποτελέσματα των μεταλλαγών που επάγονται από την ακτινοβολία μπορούν να ληφθούν από την εξέταση των χρωμοσωμάτων τη στιγμή που ολοκληρώνουν την κυτταρική διαίρεση. Τα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου ποικίλουν ως προς την ευαισθησία στη δράση της ακτινοβολίας, ενώ ο τύπος των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που επάγονται ποικίλει ανάλογα το στάδιο στο οποίο βρισκόταν το κύτταρο κατά την ακτινοβολία. Γι' αυτό καθίσταται σημαντική η ανάλυση των φάσεων από τις οποίες περνά ένα κύτταρο από τη στιγμή που δημιουργείται.

## 2. Επιδράσεις ακτινοβολίας και βιολογικά αποτελέσματα στο κύτταρο - Βιοδοσιμετρία

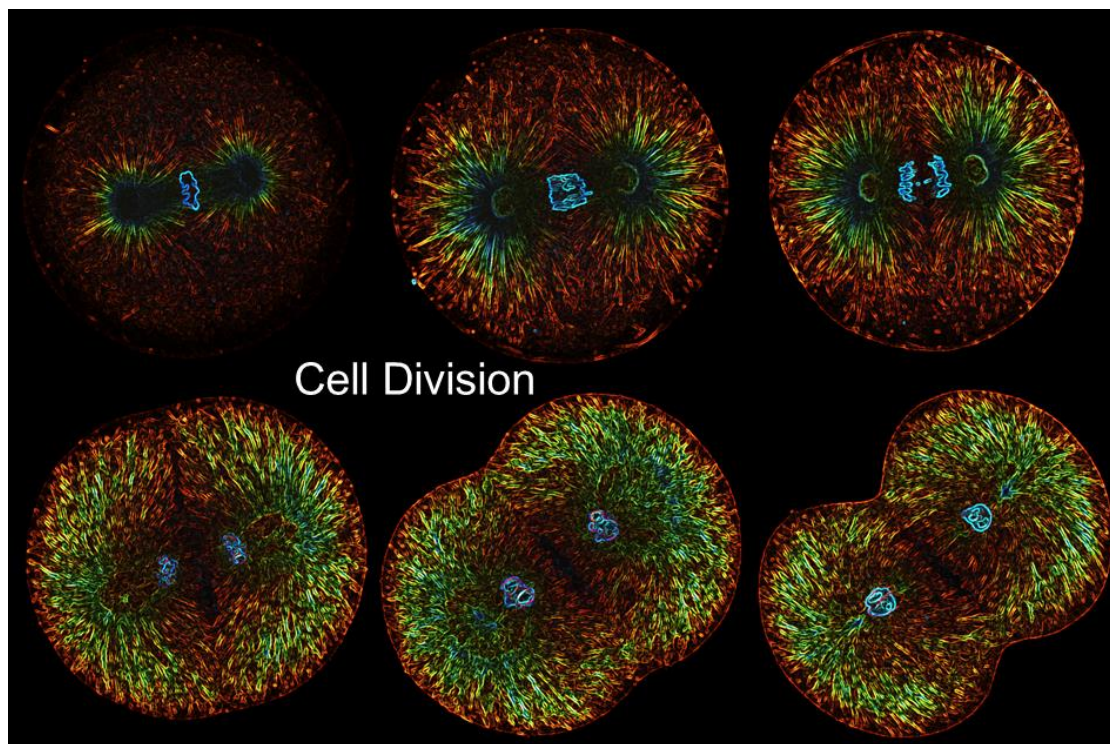
Κάθε κύτταρο έχει έναν κύκλο ζωής, ο οποίος ονομάζεται κυτταρικός κύκλος και ορίζεται ως το χρονικό διάστημα από τη δημιουργία ενός κυττάρου έως τη στιγμή που θα διαιρεθεί και θα δημιουργήσει απογόνους.



Εικόνα 2.1 Ο κυτταρικός κύκλος  
Πηγή: Bioninja

Ο κυτταρικός κύκλος έχει δύο φάσεις: τη μεσόφαση και τη μίτωση. Η μεσόφαση αποτελεί περίπου το 90-95% της ζωής του κυττάρου και αποτελεί διάστημα προετοιμασίας για τη διαίρεση που επίκειται και διάστημα διόγκωσης. Στην G<sub>1</sub> φάση, την πρώτη της μεσόφασης, μεγαλώνει ο πυρήνας και το κύτταρο συνθέτει

RNA και πρωτεΐνες, προετοιμαζόμενο για τη μιτωτική φάση, ενώ παράλληλα τελεί και τις απαραίτητες λειτουργίες αναλόγως τον τύπο του (νευρικό κύτταρο, μυϊκό, οστικό κτλ). Στο στάδιο αυτό τα χρωμοσώματα είναι μονονηματικά, αποτελούνται από μια διπλή έλικα DNA, λεπτά κι ανακατωμένα στον πυρήνα (σα μπλεγμένα νήματα). Έπειτα ακολουθεί η S φάση, στην οποία γίνεται ο διπλασιασμός του DNA με τη διαδικασία της αντιγραφής. Εν συνεχεία, η μεταβατική φάση G<sub>2</sub> του κυτταρικού κύκλου, πριν την έναρξη της μίτωσης, είναι αυτή στην οποία οργάνιδια όπως τα μιτοχόνδρια και κεντροσώματα διαιρούνται, προετοιμάζοντας το κύτταρο για τη διαδικασία της μίτωσης. Στον άνθρωπο, όπως και σε άλλα σπονδυλωτά, η G<sub>2</sub> φάση έχει το G<sub>2</sub>-checkpoint/σημείο ελέγχου βλάβης της G<sub>2</sub>, ώστε να διακόπτεται ο κυτταρικός κύκλος πριν την εισαγωγή του κυττάρου που έχει βλάβη στη μιτωτική φάση. Γι' αυτό η G<sub>2</sub> φάση παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον προς μελέτη, καθώς έχει παρατηρηθεί πως κάποιοι τύποι καρκίνου προσπερνούν τη φάση αυτή και από το διπλασιασμό του DNA περνά, το καρκινικό κύτταρο, κατευθείαν στη μίτωση. Τελική φάση είναι η μιτωτική (M), την οποία χωρίζουμε στην πρόφαση, τη μετάφαση, την ανάφαση και την τελόφαση.

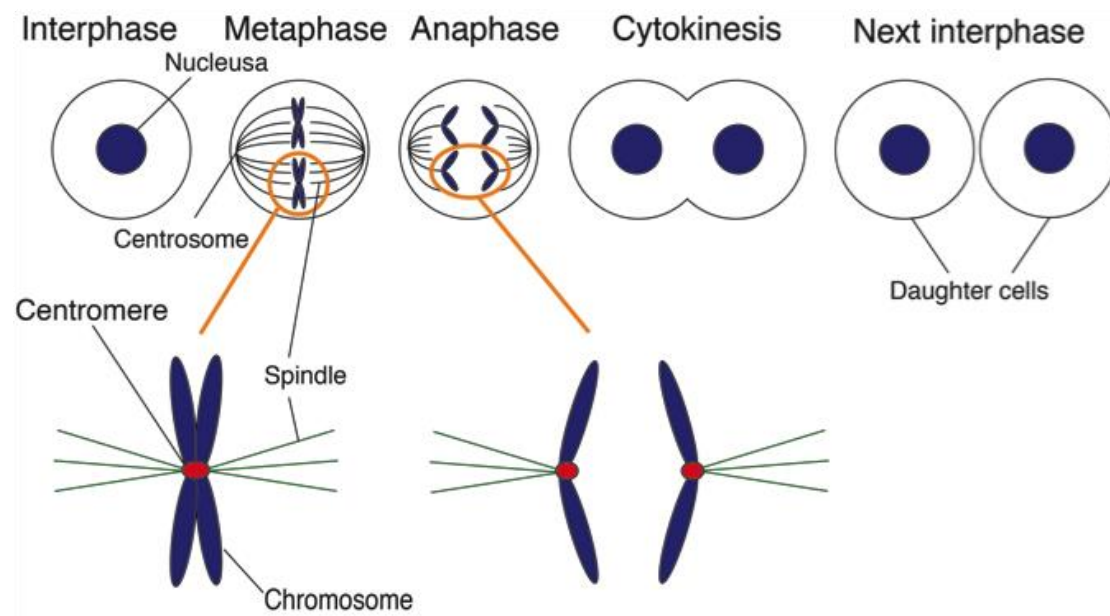


Εικόνα 2.2 Μιτωτική διαίρεση ενός κυττάρου  
Πηγή: Creativebiomart

Στην πρόφαση τα ινίδια της χρωματίνης συσπειρώνονται και παίρνουν μορφή χρωμοσωμάτων. Κάθε χρωμόσωμα αποτελείται από δύο αδελφές χρωματίδες ενωμένες στο κεντρομερίδιο, όπου η κάθε μια αποτελείται από ένα δίκλωνο μόριο DNA και είναι γενετικά πανομοιότυπες. Στην πρόφαση εξαφανίζεται η πυρηνική



μεμβράνη και οι πυρηνίσκοι και σχηματίζεται η άτρακτος με τη βοήθεια των κεντροσωμάτων που έχουν διπλασιαστεί στη μεσόφαση. Στη μετάφαση τα χρωμοσώματα, που έχουν σκορπίσει τυχαία στο κύτταρο, αρχίζουν να κατευθύνονται στο ισημερινό του επίπεδο, ώστε στην ανάφαση με τη βοήθεια της άτρακτου, που «δένεται» στα κεντρομερίδια και αρχίζει να συσπειρώνεται, να διαιρεθούν και κάθε αδελφή χρωματίδη να γίνει ένα ανεξάρτητο χρωμόσωμα. Στο τελευταίο στάδιο, στην τελόφαση, η άτρακτος αποδιοργανώνεται και εμφανίζονται πυρηνικοί φάκελοι. Δημιουργούνται κατά συνέπεια δύο θυγατρικοί πυρήνες των οποίων τα χρωμοσώματα επανέρχονται σε μορφή κουβαριού χρωματίνης.



Εικόνα 2.3 Κατάσταση του DNA αναλόγως της φάσης του κυτταρικού κύκλου

Πηγή: An evolutionary breakpoint in cell division, July 31, 2017, Osaka University

Μετά τη διαίρεση ενός κυττάρου αυτό μπορεί να:

- A. Εισέλθει στη G<sub>1</sub> φάση και να ακολουθήσει νέα μιτωτική διαίρεση
- B. Διαφοροποιηθεί και να παραμείνει σε μια νέα φάση ηρεμίας, εκτός κυτταρικού κύκλου, χάνοντας την ικανότητα για περαιτέρω διαιρέσεις. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται ως G<sub>0</sub> φάση, στην οποία τα κύτταρα διακρίνονται από έλλειψη αναπαραγωγικών δραστηριοτήτων.

Τα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου διαφέρουν ως προς την ευαισθησία στην δράση της ακτινοβολίας, ενώ ο τύπος των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που επάγονται ποικίλει εξαρτώμενος από το στάδιο στο οποίο βρίσκεται το κύτταρο κατά την ακτινοβολήση. Οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις είναι ορατές κατά την περίοδο της μιτωτικής διαίρεσης του κυττάρου, όπου διαλύεται η πυρηνική μεμβράνη και τα χρωμοσώματα είναι ορατά.

## 2.1 Κατάταξη χρωμοσωμικών ανωμαλιών

Τα χρωμοσώματα, μετά την ακτινοβολήσή τους, εμφανίζουν μεταβολές στη φυσικοχημική τους κατάσταση. Η σπουδαιότερη δράση της ακτινοβολίας στα χρωμοσώματα αποτελεί η διάσπασή τους, η οποία επιφέρει ποικιλία μορφολογικών αλλοιώσεων, η επαγωγή των οποίων βασίζεται στους εξής μηχανισμούς:

1. Το κεντρικό τεμαχίδιο του χρωμοσώματος, δηλαδή αυτό που περιέχει το κεντρομερίδιο, διατηρείται και μετά την ολοκλήρωση του κυτταρικού κύκλου μεταφέρεται στα θυγατρικά κύτταρα. Το παραγόμενο χρωμόσωμα φέρει μια έλλειψη γενετικού υλικού, μικροσκοπικά ορατή, που χαρακτηρίζεται ως διαγραφή (deletion). Το περιφερειακό τεμαχίδιο του διασπασμένου χρωμοσώματος, το οποίο δε διαθέτει κεντρομερίδιο, δεν μπορεί να χωριστεί κατά τη μίτωση, με αποτέλεσμα είτε να χαθεί στη μίτωση, είτε να μεταβιβαστεί σε ένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα.
2. Τα τεμαχίδια στα οποία διασπάστηκε το χρωμόσωμα μπορούν να συνενωθούν μεταξύ τους ή με άλλα χρωμοσώματα, ώστε να δημιουργηθούν ανώμαλες μορφές χρωμοσωμάτων. [34][35]

## 2.2 Παράγοντες που επιδρούν στο βιολογικό αποτέλεσμα της ακτινοβολήσης

Οι βιολογικές επιδράσεις της ακτινοβολίας διαφέρουν και εξαρτώνται από παράγοντες που αναφέρονται ως τροποποιητικοί μηχανισμοί.

### 2.2.1 Φυσικοί τροποποιητικοί μηχανισμοί

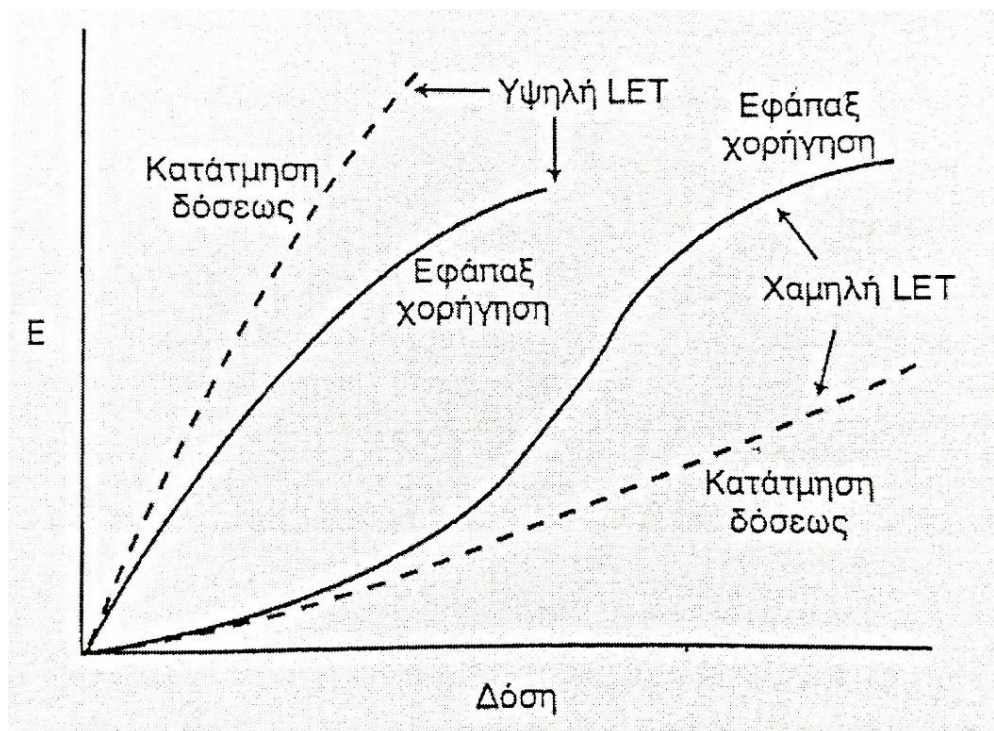
- **Ευθύγραμμη μετάδοση ενέργειας (LET) και σχετική βιολογική δραστηριότητα (RBE)**

Στους φυσικούς τροποποιητικούς μηχανισμούς ανήκει η απώλεια ενέργειας ανά μονάδα μήκους διαδρομής, που είναι γνωστή σαν ευθύγραμμη μετάδοση ενέργειας (Linear Energy Transfer-LET). Ακτινοβολίες με μεγάλη LET έχουν και μεγάλη σχετική βιολογική δραστηριότητα (RBE), λόγω μεγάλου συντελεστή ποιότητας Q. Η σχετική βιολογική δραστηριότητα ορίζεται ως ο λόγος της

απορροφούμενης δόσης αναφοράς χαμηλής LET προς τη δόση της υπό εξέτασης ακτινοβολίας  $R$  που προκαλεί βιολογικά αποτελέσματα. Η τιμή της σχετικής βιολογικής δραστηριότητας εξαρτάται από το είδος, την ενέργεια της ακτινοβολίας και από το ακτινοβολούμενο υλικό.

### • Κατάτμηση δόσης

Στην κατηγορία των φυσικών τροποποιητικών μηχανισμών ανήκει και ο παράγοντας της κατάτμησης της δόσης. Αν μια δόση ακτινοβολίας  $D$  χαμηλής LET χορηγηθεί πχ σε δύο κλάσματα  $D/2 + D/2$  με διαφορά χρόνου λίγων ωρών, τότε το βιολογικό αποτέλεσμα είναι μικρότερο από αυτό που περιμέναμε αν δώναμε εφάπαξ δόση. Αυτό οφείλεται στο ότι δίδεται χρόνος για την ανάπτυξη επιδιορθωτικών μηχανισμών που θα ελαττώσουν το αποτέλεσμα της ακτινοβολήσης. Στην περίπτωση ακτινοβολίας υψηλής LET η εφάπαξ χορήγηση είναι αποτελεσματικότερη σε συνέπεια του ότι ελαχιστοποιείται η διαφοροποίηση της ακτινοευαισθησίας μεταξύ διαφόρων κυττάρων ή μεταξύ των αυτών κυττάρων, αλλά σε διαφορετική φάση του κυτταρικού κύκλου. [34][35]



Εικόνα 2.2.1.1 Γραφική αναπαράσταση του αποτελέσματος της κατάτμησης δόσης  $E$  είναι διαφορετικό μεταξύ χαμηλής και υψηλής LET

Πηγή: «Ιατρική Φυσική» Π. Ψαρράκος, 2005

- **Ρυθμός χορήγησης της δόσης**

Το αποτέλεσμα της ακτινοβολήσης καθορίζεται, επίσης, από το ρυθμό χορήγησης της δόσης. Η ακτινοβολήση με χαμηλό ρυθμό δόσης είναι αποδοτικότερη από την ακτινοβολήση με υψηλό ρυθμό δόσης, γιατί κατά τη χορήγηση ακτινοβολήσης χαμηλού ρυθμού απαιτείται περισσότερος χρόνος κι έτσι τα κύτταρα έχουν πιο πολύ χρόνο για την πλήρη ανάνηψη των ιστών από ακτινική βλάβη.

Στην ακτινοθεραπεία η κατάτμηση της δόσης, ώστε η θεραπεία να γίνει σε περισσότερες εβδομάδες από το να δίνεται όλη η δόση σε μια θεραπεία, είναι ασφαλέστερη. Για την επίτευξη του επιθυμητού βιολογικού αποτελέσματος, η συνολική δόση όταν η θεραπεία γίνεται σε δόσεις, πρέπει να είναι πολύ μεγαλύτερη από ότι αν η δόση δινόταν σε μια θεραπεία. Η βάση που στηρίζεται η θεωρία αυτή είναι ο κανόνας των 5 Rs. Τα 5 Rs της ακτινοθεραπείας είναι:

1. Radiosensitivity - Ακτινοευαισθησία
2. Repair - Επιδιόρθωση
3. Repopulation – Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται όταν λαμβάνουν κατατμημένη δόση
4. Redistribution – Ανακατανομή στα κύτταρα που διαφοροποιούνται καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου αυξάνει τα κύτταρα που σκοτώνονται στις κατατμημένες θεραπείες παρά με την εφάπαξ δόση.
5. Reoxygenation – Η επαναοξυγόνωση των υποξικών κυττάρων συμβαίνει κατά τη διάρκεια μιας κατατμημένης θεραπείας κάνοντας τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στην επερχόμενη ακτινοβολία.

### *2.2.2 Χημικοί τροποποιητικοί μηχανισμοί*

- **Τάση οξυγόνου στους ιστούς**

Η απόκριση των κυττάρων στην ιοντίζουσα ακτινοβολία εξαρτάται ισχυρά από την οξυγόνωση των κυττάρων. Η τάση του οξυγόνου στους φυσιολογικούς ιστούς αποτελεί ένα χημικό τροποποιητικό μηχανισμό και κυμαίνεται μεταξύ 10-50mmHg με εξαίρεση τον πνεύμονα. Στις νεοπλασίες παρατηρείται μειωμένη τάση οξυγόνου. Η ελάττωση της τάσης οξυγόνου προστατεύει τα κύτταρα από τις βιολογικές επιδράσεις της ακτινοβολίας, λόγω της συμβολής του οξυγόνου στη δημιουργία περεταίρω ελευθέρων ριζών. Ιδιαίτερα για ακτινοβολίες χαμηλού LET, όσο μεγαλύτερη είναι η οξυγόνωση του κυττάρου, τόσο μεγαλύτερο είναι το



βιολογικό αποτέλεσμα μέχρι να έρθει ο κορεσμός από το αποτέλεσμα που φέρνει η οξυγόνωση. Ο λόγος των δόσεων σε ένα βιολογικό σύστημα για την εμφάνιση ενός ακτινοπρόκλητου φαινομένου σε μια συνήθη τάση οξυγόνου ως προς αυτήν απουσία οξυγόνου, ονομάζεται λόγος επαυξήσεως της ακτινοευαισθησίας – oxygen enhancement ratio (OER).

$$OER = \frac{H \text{ δόση ακτινοβολίας χωρίς οξυγόνο}}{H \text{ δόση ακτινοβολίας με οξυγόνο}}$$

- **Χημειοευαισθητοποίηση**

Επιπρόσθετα, υπάρχουν διάφορες χημικές ουσίες που μπορούν να αυξήσουν ή να μειώσουν την ακτινοευαισθησία. Είναι δραστικές μόνο όταν είναι παρούσες κατά τη στιγμή της ακτινοβολήσης, όπως για παράδειγμα η καφεΐνη αυξάνει την ακτινοευαισθησία των ατόμων. [34] [35]

### 2.2.3 Βιολογικοί τροποποιητικοί μηχανισμοί

Το είδος του κυττάρου και η φάση του κυτταρικού κύκλου (βιολογικοί τροποποιητικοί μηχανισμοί), στην οποία αυτό βρίσκεται, παρουσιάζουν διακυμάνσεις ως προς τα αποτελέσματα που επάγει η ιοντίζουσα ακτινοβολία.

- **Το είδος του κυττάρου**

Τα κύτταρα ενδογενώς παρουσιάζουν διαφορά στην ακτινοευαισθησία τους. Σύμφωνα με το νόμο των Bergonie και Tribondeau, η ακτινοευαισθησία των κυττάρων είναι ανάλογη της μεταβολικής δραστηριότητάς τους. Σε επίπεδο ιστών, η ακτινοευαισθησία είναι ανάλογη με το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων του και το ρυθμό ανάπτυξής τους.

- **Η φάση του κυτταρικού κύκλου**

Η ακτινοευαισθησία είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Για παράδειγμα τα νευρικά κύτταρα που έχουν υψηλή διαφοροποίηση είναι λιγότερο ακτινοευαίσθητα. Επίσης, η ακτινοευαισθησία των κυττάρων παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές στις διάφορες φάσεις του

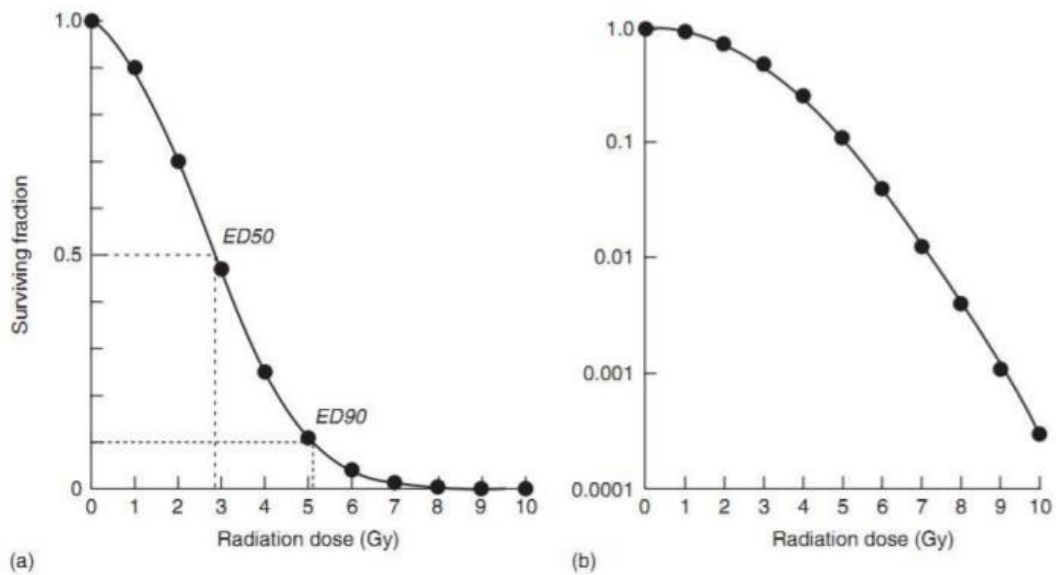
κυτταρικού κύκλου. Η μεσόφαση (G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>) διαρκεί 24-48h, ενώ η μίτωση περίπου 2h. Πιο ευαίσθητες φάσεις, γενικά, είναι η μίτωση και η G<sub>2</sub>, ενώ υπάρχει μια τάση από τα κύτταρα κατά τη φάση S και ειδικά προς το τέλος της να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην ακτινοβολία. Η αυξημένη αντίσταση σχετίζεται με τη σύνθεση του DNA, ενώ η μικρή αντίσταση στη G<sub>2</sub> οφείλεται μάλλον στη μικρή διάρκεια της φάσης, που δεν επιτρέπει πλήρη δράση των επιδιορθωτικών μηχανισμών. [34] [35]

## 2.3 Καμπύλες επιβίωσης των κυττάρων

Οι καμπύλες επιβίωσης των κυττάρων περιγράφουν τον πληθυσμό των κυττάρων που επιβίωσε μετά από έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία και της απορροφούμενης δόσης. Ο όρος «επιβιώνουν» αναφέρεται στη διατήρηση της ικανότητας των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται με το συνήθη τρόπο.

Σύμφωνα με τη θεωρία του στόχου, μια μόνο πλήξη σε δύο ή περισσότερους στόχους συνήθως είναι αρκετή για να προκληθεί θάνατος του κυττάρου. Μια εκθετική καμπύλη επιβίωσης μπορεί να περιγραφεί με την εξίσωση της μορφής  $N = N_0 e^{-\frac{D}{D_0}}$ , όπου  $N_0$  ο αρχικός αριθμός κυττάρων,  $N$  ο αριθμός των κυττάρων που επιβιώνει μετά την ακτινοβολία,  $D$  η δόση ακτινοβολίας και  $D_0$  η απαιτούμενη δόση, κατά μέσο όρο, η οποία όταν χορηγηθεί μπορεί να μειώσει το κλάσμα των κυττάρων που επιβιώνουν στο 37%. Η τιμή της  $D_0$  για ακτινοβολίες χαμηλού LET είναι συνήθως 1-2 Gy. Ο αριθμός  $N$  μας δείχνει το βαθμό ακτινοευαισθησίας των κυττάρων και είναι αντιστρόφως ανάλογος με αυτήν.

Άλλο σημαντικό μέγεθος είναι το  $D_q$ , που ορίζεται ως η δόση σε Gy και αντιστοιχεί στο εκθετικό τμήμα της καμπύλης, η οποία τέμνει τον άξονα επιβίωσης, σε κλάσμα κυττάρων ίσο με τη μονάδα, όταν δηλαδή η επιβίωση είναι 100%.

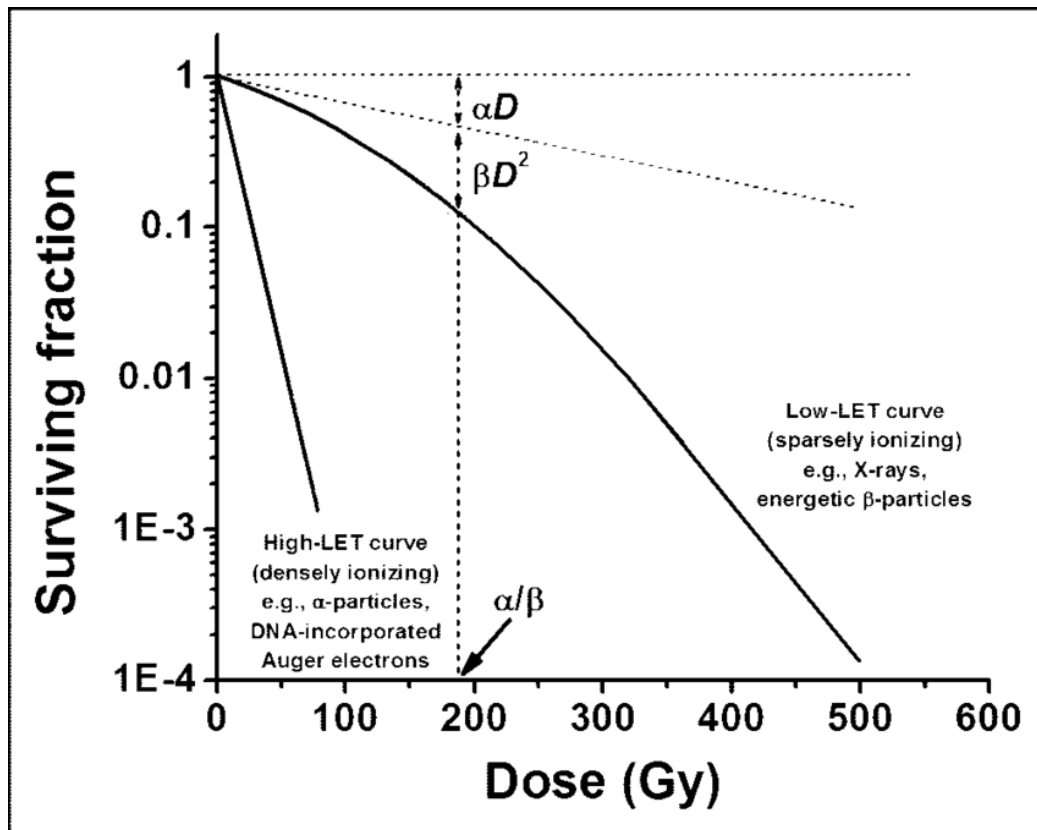


**Figure 4.3** A typical cell survival curve for cells irradiated in tissue culture, plotted (a) on a linear survival scale. (b) The same data plotted on a logarithmic scale.

#### Εικόνα 2.3.1 Καμπύλες επιβίωσης κυττάρων

Πηγή: Cell Survival Curve presentation, Abish Adhikari, Radiation Oncologist 2012.01.126

Για τον καθορισμό της καμπύλης επιβίωσης χρησιμοποιούνται διάφορα μαθηματικά μοντέλα, τα οποία βασίζονται στην τυχαία φύση της εναπόθεσης ενέργειας της ακτινοβολίας. Το μοντέλο που χρησιμοποιείται πιο συχνά για την περιγραφή της επιβίωσης κυττάρων θηλαστικών μετά από ακτινοβόληση χαμηλού LET είναι αυτό που δίνεται από τη σχέση  $S(D) = e^{-\alpha D - bD^2}$ , όπου  $S$  είναι το κλάσμα του πληθυσμού που επιβίωσε,  $D$  η δόση της ακτινοβολίας και  $\alpha$ ,  $b$  σταθερές. Ο όρος  $\alpha$  είναι ανάλογος της δόσης και μέτρο της ενδογενούς ακτινοευαισθησίας του συγκεκριμένου είδους ακτινοβολούμενων κυττάρων για πρόκληση βλάβης που δεν μπορεί να επιδιορθωθεί, ενώ ο όρος  $b$ , που είναι ανάλογος με το τετράγωνο της δόσης, αντιστοιχεί στις βλάβες που πρέπει να συσσωρευθούν πριν γίνουν θανατηφόρες.



Εικόνα 2.3.2 Καμπύλη επιβίωσης

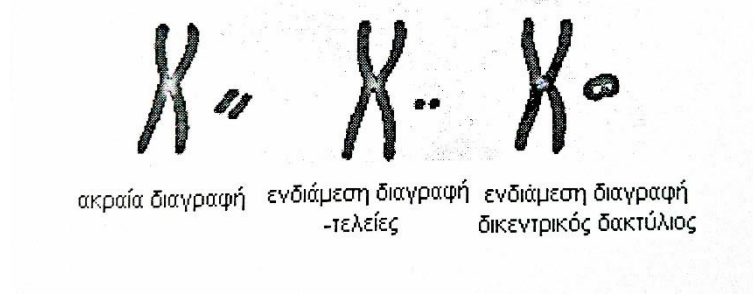
Πηγή: Radiobiologic principles in radionuclide therapy, Journal of Nuclear Medicine 46(Suppl 1):4S-12S · January 2005

## 2.4 Ακτινοβόληση στη Go φάση του κυτταρικού κύκλου – Βιοδοσιμετρία

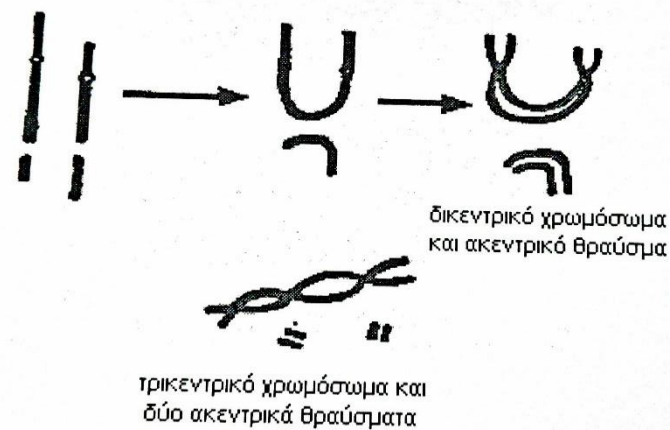
### 2.4.1 Χρωμοσωμικές αλλοιώσεις

Οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις που επάγονται από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας κατά τη Go φάση του κυτταρικού κύκλου, που δεν έχει διπλασιαστεί ακόμα το DNA, χαρακτηρίζονται ως αλλοιώσεις χρωμοσωμικού τύπου. Στην περίπτωση αυτή τα χρωμοσώματα συμπεριφέρονται ως ενιαία κατά τη διάσπασή τους και η βλάβη είναι ορατή και στις δύο χρωματίδες. Οι ανωμαλίες χρωμοσωμικού τύπου μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής κατηγορίες:

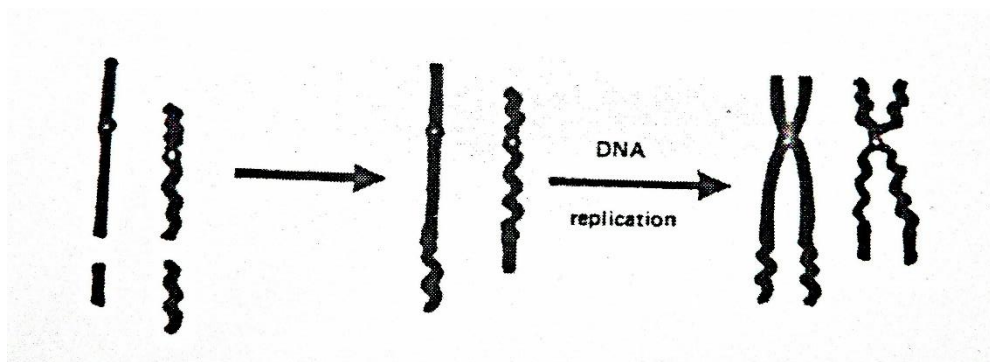
- ❖ Ακραίες και ενδιάμεσες διαγραφές (terminal and interstitial deletion)



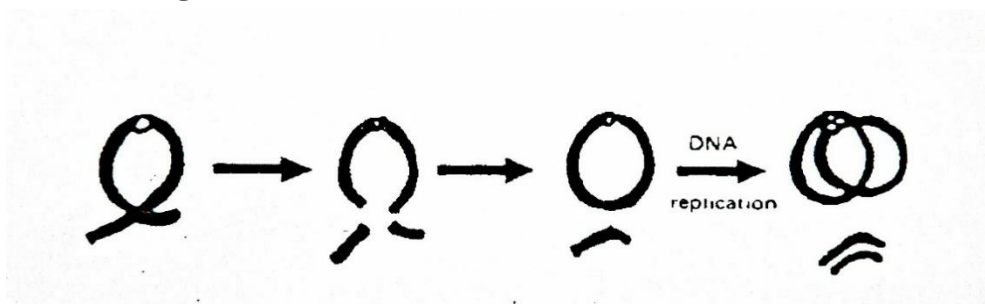
- ❖ Ασύμμετρες ανταλλαγές μεταξύ δύο χρωμοσωμάτων (asymmetrical interchanges)



- ❖ Ασύμμετρες εσωτερικές ανταλλαγές (asymmetrical interchanges)

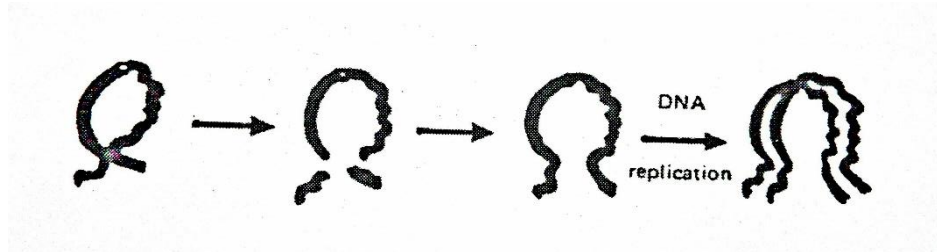


- ❖ Συμμετρικές ανταλλαγές μεταξύ των δύο χρωμοσωμάτων (symmetrical interchanges)

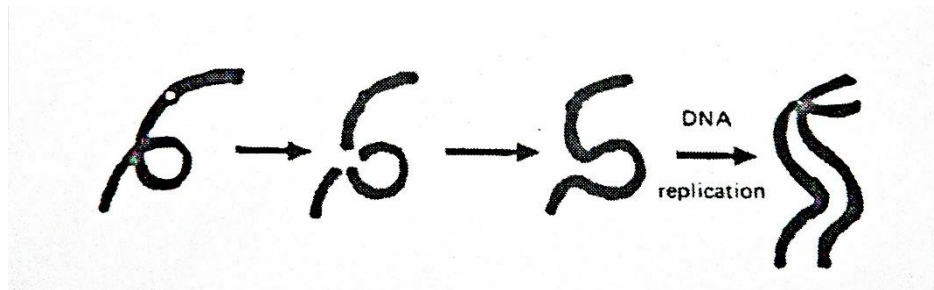


## ❖ Συμμετρικές εσωτερικές ανταλλαγές (symmetrical interchanges)

- Περικεντρικές αναστροφές: συμβαίνουν γύρω από το κεντρομερίδιο



- Περικεντρικές αναστροφές: συμβαίνουν από τη μια πλευρά του κεντρομεριδίου



Οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις που εμφανίζονται πιο συχνά κατά την ακτινοβόληση στη Go φάση το κυτταρικού κύκλου είναι:

- ✓ Τα δικεντρικά χρωμοσώματα που είναι χρωμοσώματα τα οποία έχουν δύο κεντρομερίδια. Κατά την ακτινοβόληση δύο ξεχωριστών χρωμοσωμάτων προκαλείται σπάσιμο στο χρωμόσωμα. Οι δύο σπασμένες άκρες είναι δυνατόν να ενωθούν λανθασμένα και δυο θραύσματα με κεντρομερίδιο να ενωθούν μεταξύ τους. Μετά από διπλασιασμό του DNA εμφανίζεται ένα δικεντρικό χρωμόσωμα κι ένα ή δύο άκεντρα θραύσματα. Τρικεντρικά χρωμοσώματα που είναι δυνατόν να εμφανιστούν αντιστοιχούν σε δύο δικεντρικά χρωμοσώματα και συνοδεύονται από δύο άκεντρικά θραύσματα.
- ✓ Οι κεντρικοί δακτύλιοι που προκύπτουν από σπάσιμο και των δύο τμημάτων του χρωμοσώματος. Οι άκρες συνδέονται ώστε να σχηματίζεται ένα κεντρικό δακτυλίδι κι ένα άκεντρικό θραύσμα.
- ✓ Τα άκεντρικά θραύσματα, τα οποία είναι χρωμοσώματα χωρίς κεντρομερίδιο, προκύπτουν ανεξάρτητα από τις αλλοιώσεις που περιγράφονται παραπάνω. [34] [35]

#### *2.4.2 Ανάγκη αναζήτησης και ανάπτυξης βιολογικής μεθοδολογίας για την αξιολόγηση ατυχημάτων με ιοντίζουσες ακτινοβολίες*

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ευρέως για την αξιολόγηση ατυχημάτων με ιοντίζουσες ακτινοβολίες στηρίζονται γενικά σε διάφορες φυσικές μετρήσεις όπως αυτές που παρέχονται από όργανα ρυθμού έκθεσης ακτινοβολίας, προσωπικά δοσίμετρα κ.λ.π.. Τα όργανα αυτά δεν αναγνωρίζονται ως τα πλέον αξιόπιστα για τον προσδιορισμό της απορροφούμενης δόσης και γενικά την εκτίμηση της επικινδυνότητας της, έτσι θεωρήθηκε αναγκαίο, παράλληλα με τις φυσικές μεθόδους, να αναπτυχθούν και βιολογικές μέθοδοι, ώστε να επιβεβαιώνουν με βιολογική πλέον αξιοπιστία την υπερέκθεση και να συμβάλλουν στον προσδιορισμό της απορροφούμενης δόσης. <sup>[21] [22] [32]</sup>

### 3. Βιοδοσιμετρία με κυτταρογενετικές μεθόδους

Η βιοδοσιμετρία ιοντιζουσών ακτινοβολιών αναφέρεται στη μεθοδολογία εκτίμησης της απορροφούμενης δόσης ακτινοβολίας με βάση την απόκριση ενός βιολογικού δοσίμετρου. Ως βιολογικά δοσίμετρα χρησιμοποιούνται διάφορες ουσίες ή κυτταρικά συστήματα που βρίσκονται κυρίως στα βιολογικά υγρά του σώματος, στα οποία οι μεταβολές που συμβαίνουν και η απόκρισή τους εν γένει μετά από έκθεση σε ακτινοβολία σχετίζονται ποσοτικά με την απορροφούμενη δόση. Το ιδανικό βιολογικό δοσίμετρο, λοιπόν, πρέπει να πληρεί μια σειρά προϋποθέσεων:

- ✓ Πρέπει να εξαρτάται από τη δόση για ένα ευρύ φάσμα δόσεων αρχίζοντας από τα όρια δόσεων εξαιτίας της έκθεσης σε επαγγελματικό χώρο (20-30 mSv οξεία, 50 mSv χρόνια έκθεση), μέχρι τις δόσεις έκθεσης λόγω ατυχήματος, η τιμή των οποίων ανέρχεται σε πολλά Gy.
- ✓ Θα πρέπει να ανταποκρίνεται σε κάθε είδος ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην εσωτερική ακτινοβολία, τα αποτελέσματα της οποίας θα πρέπει να είναι επίσης μετρήσιμα.
- ✓ Η ανταπόκρισή του πρέπει να είναι χαρακτηριστική για κάθε είδους ιοντίζουσας ακτινοβολίας.
- ✓ Τα αποτελέσματα πρέπει να είναι διαθέσιμα σύντομα μετά την έκθεση σε ακτινοβολίας (μέχρι λίγες μέρες) σε περίπτωση ατυχήματος.
- ✓ Στο βιολογικό δοσίμετρο θα πρέπει να παραμένουν, δηλαδή να «καταγράφονται» στη μνήμη του δοσίμετρου, οι διάφορες βιολογικές μεταβολές στις οποίες βασίζεται η απόκρισή του, ώστε να είναι δυνατή η αξιολόγηση μιας υπερέκθεσης για αρκετό χρονικό διάστημα μετά από κάποιο ατύχημα.
- ✓ Η διαδικασία λήψης βιολογικών δειγμάτων για ανάλυση πρέπει να είναι απλή και ακίνδυνη. Επιπλέον, η μεθοδολογία της ανάλυσης πρέπει να είναι εύκολη, ώστε να μπορεί να εισαχθεί στην καθημερινή πρακτική προγραμμάτων ακτινοπροστασίας και να δίνει αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Η έρευνα για ένα βιολογικό δοσίμετρο έχει προσανατολιστεί σε ακτινοευαίσθητα κυτταρικά συστήματα και κυρίως σε βιολογικές δομές που οι προκληθείσες αλλοιώσεις από ακτινοβολία δεν μπορούν να επιδιορθωθούν, επιδιορθώνονται εσφαλμένα. Τέτοιες δομές υπάρχουν στο γενετικό υλικό των κυττάρων, ιδιαίτερα των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Οι λόγοι επιλογής των λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος ως βιολογικό δοσίμετρο είναι κυρίως οι εξής:

- ✓ Τα λεμφοκύτταρα είναι εξαιρετικά ακτινοευαίσθητα.



- ✓ Κυκλοφορούν σε όλους τους ιστούς του ανθρωπίνου σώματος, είναι παρόντα σε κάθε είδους έκθεση και μπορούν εύκολα να ληφθούν από το περιφερειακό αίμα.
- ✓ Είναι διαφοροποιημένα κύτταρα, συγχρονισμένα στη G φάση και ορισμένα από αυτά θεωρείται ότι ζουν για αρκετά χρόνια. Επειδή δε σε υγιείς ανθρώπους δεν πολλαπλασιάζονται στο περιφερειακό αίμα, οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις συσσωρεύονται με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η ανάλυσή τους ακόμα και μετά την πάροδο μεγάλου χρονικού διαστήματος από κάποιο ατύχημα. [32][34][35]

### 3.1 Η κλασική κυτταρογενετική μέθοδος βιοδοσιμετρίας

Η κλασική κυτταρογενετική μεθοδολογία βιοδοσιμετρίας στηρίζεται στη μελέτη των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων και ανακατατάξεων που προκαλούνται από την αλληλεπίδραση του γενετικού υλικού με ιοντίζουσα ακτινοβολία. Τα δικεντρικά χρωμοσώματα, τα οποία εμφανίζονται με συχνότητα δέκα φορές μεγαλύτερη από τους δακτυλίους, συνοδεύονται, συνήθως, από χρωμοσωμικά θραύσματα, η ύπαρξη των οποίων αποτελεί κριτήριο για καταμέτρησή του και η συχνότητα εμφάνισής τους ανά κύτταρο είναι συνάρτηση της απορροφούμενης δόσης. Χρησιμοποιώντας τις αλλοιώσεις αυτές ως δείκτη της έκθεσης, η απορροφούμενη δόση προσδιορίζεται μέσω πρότυπων καμπυλών αναφοράς, οι οποίες κατασκευάζονται από *in vitro* ακτινοβολήση περιφερικού αίματος. Οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς έχουν γενικά τη μορφή γραμμικής-δευτεροβάθμιας:

$$Y=c+\alpha D+\beta D^2$$

Όπου  $Y$  ο αριθμός δικεντρικών χρωμοσωμάτων ανά κύτταρο,  $D$  η απορροφούμενη δόση ακτινοβολίας σε grays και  $\alpha$ ,  $\beta$  συντελεστές που εξαρτώνται από παράγοντες όπως το είδος της ακτινοβολίας και δίνονται από πίνακες. Σε ολόσωμες οξείες εκθέσεις μεγαλύτερες από 0.1 gray, η μελέτη των επαγόμενων δικεντρικών χρωμοσωμάτων είναι ικανή να προσδιορίσει την απορροφούμενη δόση ακτινοβολίας με ικανοποιητική ακρίβεια, σε επίπεδα εμπιστοσύνης 95%, βάση στατιστικής Poisson.

Τα επαγόμενα από την ακτινοβολία δικεντρικά χρωμοσώματα, στα οποία βασίζεται η κλασική αυτή μεθοδολογία βιοδοσιμετρίας, είναι από τη φύση τους ασταθή. Αυτό οφείλεται στον πεπερασμένο χρόνο ζωής των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος και στην αντικατάστασή τους μετά από πολλαπλασιασμό αρχηγόνων κυττάρων κυρίως του μυελού των οστών. Η αντικατάστασή τους πραγματοποιείται από νέα που δε φέρουν τέτοιου είδους μη συμβατές με την

κυτταρική διαίρεση αλλοιώσεις. Ο χρόνος ζωής των λεμφοκυττάρων είναι περίπου 3 χρόνια.

Οπότε είναι φανερό ότι η αξιοπιστία της μεθόδου ελαττώνεται με την πάροδο του χρόνου. Επίσης, η διαδικασία είναι χρονοβόρος, αφού απαιτεί 48h καλλιέργειας και πρόσθετο χρόνο ανάλυσης. Επομένως, η μέθοδος αυτή δεν προσφέρεται για εκτίμηση της δόσης σε περιπτώσεις που έχει παρέλθει μεγάλο χρονικό διάστημα από κάποιο ατύχημα. <sup>[41]</sup>

### 3.2 Μέθοδος πρόωρης χρωμοσωμικής συμπύκνωσης (PCC)

Για τον προσδιορισμό της απορροφούμενης δόσης σε πολύ πιο σύντομο χρονικό διάστημα χρησιμοποιείται η μέθοδος πρόωρης χρωμοσωμικής συμπύκνωσης (PCC). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, μονοπυρηνικά κύτταρα, κυρίως λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος, συντήκονται με μιτωτικά κύτταρα hamster (CHO) υπό την επίδραση μιας χημικής συντιξιογόνου ουσίας (πολυαιθυλενγλυκόλης – PEG). Κατά τη σύντηξη, η πυρηνική μεμβράνη των λεμφοκυττάρων που βρίσκονται στη Go φάση του κυτταρικού κύκλου σπάει, με αποτέλεσμα να γίνεται ορατό το εσωτερικό του πυρήνα τους, χωρίς αυτά να βρίσκονται στη φάση της μίτωσης. Έτσι είναι δυνατή η απευθείας ανάλυση χρωμοσωμικών αλλοιώσεων σε μεσοφασικά χρωμοσώματα λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος, αποφεύγοντας την καθυστέρηση των 48h της κλασικής κυτταρογενετικής μεθόδου.

Παρόλα αυτά και η τεχνική αυτή βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των δακτυλίων και δικεντρικών χρωμοσωμάτων που είναι ασταθείς αλλοιώσεις και μειώνονται με την πάροδο του χρόνου. Οπότε η ευαισθησία και αξιοπιστία αυτής της μεθόδου ελαττώνεται όσο αυξάνεται το χρονικό διάστημα από την ημέρα που έγινε η έκθεση στην ακτινοβολία.

### 3.3 Μέθοδοι βιοδοσιμετρίας που βασίζονται στην ανίχνευση σταθερών χρωμοσωμικών αλλοιώσεων

Για την εκτίμηση δόσεων από ατυχήματα παρελθόντων ετών, όπως στο ατύχημα του Τσερνομπίλ, κυτταρογενετικές μέθοδοι δεν ήταν δυνατό να πραγματοποιηθούν. Έχει μεγάλη σημασία να εκτιμηθούν αναδρομικά οι

απορροφούμενες δόσεις με μεθόδους βιοδοσιμετρίας, ώστε να χρησιμοποιηθούν στις σχετικές επιδημιολογικές μελέτες που διεξάγονται σχετικά με τα απώτερα αποτελέσματα των ακτινοβολιών στην υγεία των ατόμων που έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολία.

Οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες, εκτός από ασταθείς χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, επάγουν και αλλοιώσεις συμβατές με την κυτταρική διαίρεση. Οι αλλοιώσεις αυτές είναι ανακατατάξεις και μετατοπίσεις το χρωμοσωμικού υλικού, τέτοιες ώστε το γονιδίωμα στο σύνολό του να παραμένει σταθερό. Είναι δηλαδή γονιδιακά σταθεροποιημένες και έτσι είναι δυνατό να ανιχνευθούν στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος, ακόμη και μετά από την πάροδο δεκάδων χρόνων.

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1960, στα πλαίσια κοινών μελετών U.S. Air Force και NASA πραγματοποιήθηκαν πειράματα ακτινοβόλησης πιθήκων (*Macaca mulata*) κι οι μελέτες των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων παρουσιάστηκαν 28 χρόνια αργότερα. Η εύρεση σταθερών χρωμοσωμικών μετατοπίσεων στα κύτταρα πειραματόζων 30 χρόνια αργότερα στα ίδια επίπεδα με αυτές που επάγονται αμέσως μετά από *in vitro* ακτινοβόληση, αποτελεί ισχυρή απόδειξη παραμονής τέτοιου είδους αλλοιώσεων σε εκτιθέμενα άτομα του πληθυσμού.

Βιοδοσιμετρία με βάση τις σταθερές αυτές χρωμοσωμικές μετατοπίσεις σε περιπτώσεις εργαζόμενων με ιοντίζουσες ακτινοβολίες, έχει επίσης δώσει αποτελέσματα που συμφωνούν με τα αρχεία δοσιμετρίας τη στιγμή των εκθέσεων τους ή καθ' όλη την επαγγελματική τους ζωή.

Συνεπώς, οι αλλοιώσεις αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης και μετά την πάροδο μεγάλου χρονικού διαστήματος από ένα ατύχημα. Οι σταθερές χρωμοσωμικές μετατοπίσεις είναι σημαντικές διότι ο σχηματισμός τους συνδέεται πιθανά με τους μηχανισμούς καρκινογένεσης και η μελέτη τους θα μπορούσε να συνεισφέρει στη διαλεύκανση της καρκινογόνου δράσης των ιοντιζουσών ακτινοβολιών.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η GTG-ζώνωση χρωμοσωμάτων με Trypsin και Giemsa, η οποία επιτρέπει τον αδιαμφισβήτητο καθορισμό κάθε χρωμοσώματος. Δομικές επομένως αλυσίδες που αφορούν δύο ή περισσότερα χρωμοσώματα και εμφανίζονται συνήθως σα μετατοπίσεις ή ανταλλαγές χρωμοσωμικού υλικού μπορούν να εντοπιστούν. Η ανάλυση όμως με τη μέθοδο αυτή είναι επίπονη και χρονοβόρα και έτσι για ταχύτερα αποτελέσματα χρησιμοποιούνται εναλλακτικές μέθοδοι, όπως η τεχνική FISH (Fluorescence in Situ Hybridization) η οποία επιτρέπει την ομοιόμορφη χρώση προεπιλεγμένων χρωμοσωμάτων με τη χρήση μοριακών ανιχνευτών σημασμένων με φθορισμοφόρες ουσίες και καθιστά εύκολη την ανίχνευση μετατοπίσεων τμημάτων των επιλεγμένων χρωμοσωμάτων από τη διχρωμία που παρουσιάζουν.

Χρησιμοποιώντας ως βιολογικό δείκτη της έκθεσης τις μετατοπίσεις που ανιχνεύονται με τη FISH, η απορροφούμενη δόση είναι δυνατόν να προσδιοριστεί μέσω προτύπων καμπυλών αναφοράς. Τόσο οι σταθερές χρωμοσωμικές μετατοπίσεις, όσο και τα δικεντρικά χρωμοσώματα ως συνάρτηση της δόσης ακολουθούν γραμμική δευτεροβάθμια εξίσωση:

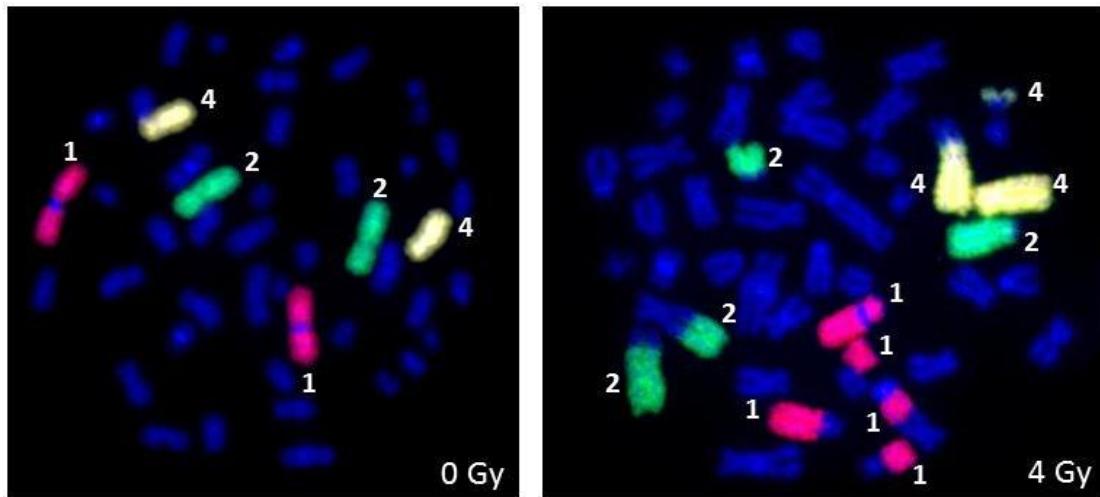
$$Y=c+\alpha D+\beta D^2$$

Η γραφική παράσταση αυτής είναι απόρροια του γεγονότος ότι οι χρωμοσωμικές αυτές αλλοιώσεις εν γένει προέρχονται είτε από αλληλεπίδραση δύο θραυσμάτων, επαγόμενων από την ίδια διαδρομή της δέσμης ακτινοβολίας αποδίδοντας τον πρωτοβάθμιο όρο της εξίσωσης, είτε από αλληλεπίδραση δύο θραυσμάτων επαγόμενων από διαφορετικές διαδρομές της ακτινοβολίας αποδίδοντας το δευτεροβάθμιο όρο.

Οι μεταπτώσεις που ανιχνεύονται με αυτόν τον τρόπο αφορούν το τμήμα του γονιδιώματος που έχει επισημανθεί και αντιπροσωπεύουν ένα μέρος των συνολικών χρωμοσωμικών μετατοπίσεων των λεμφοκυττάρων. Προκειμένου, λοιπόν, τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα με αυτά που προκύπτουν από συμβατικές μεθόδους, πρέπει να γίνει αναγωγή στο συνολικό γονιδίωμα, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα ως προς τις συνολικές αλλοιώσεις που αναμένονται ανά κύτταρο του εκτεθειμένου στην ακτινοβολία ατόμου. Με την προϋπόθεση ότι τα επαγόμενα από ακτινοβολία θραύσματα διπλής έλικας του DNA κατανέμονται τυχαία, η συχνότητα των χρωμοσωμικών μετατοπίσεων στο συνολικό γονιδίωμα δύναται να εκτιμηθεί με σχετική ακρίβεια ακόμη και όταν μόνο ένα μικρό μέρος του έχει επισημανθεί. Η αναγωγή γίνεται βάση της εξίσωσης του Lucas:

$$F_G = \frac{F_p}{2.05 f_p (1-f_p)}$$

Όπου:  $F_G$  η συχνότητα των χρωμοσωμικών μετατοπίσεων στο συνολικό γονιδίωμα,  $F_p$  η συχνότητα των μετατοπίσεων που εμφανίζονται στα επισημασμένα χρωμοσώματα και  $f_p$  το μέρος του γονιδιώματος που έχει επισημανθεί.



Εικόνα 3.3.1 Ανίχνευση ιοντίζουσας ακτινοβολίας με μέθοδο FISH με χρώση συγκεκριμένων χρωμοσωμάτων 1, 2, 4 μετά από ακτινοβολήση *ex vivo* ανθρωπίνων λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος με 4 Gy ακτίνων X.

Πηγή: *Applications of Fluorescence in Situ Hybridization in Radiation Cytogenetic Biodosimetry and Population Monitoring*

Τα μειονεκτήματα που ίσως παρουσιάζει η μέθοδος FISH προσπερνιούνται με συνδυασμό μεθόδων PCC και FISH.<sup>[41]</sup>

## 4. Ακτινοβολήση στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου – Ακτινοευαισθησία

### 4.1 Χρωμοσωμικές αλλοιώσεις

Όταν το κύτταρο ακτινοβοληθεί καθώς βρίσκεται στα στάδια του κυτταρικού κύκλου κατά τα οποία έχει γίνει ο διπλασιασμός του κυτταρικού DNA, όπως είναι η G2 φάση, προκαλούνται αλλοιώσεις χρωματιδικού τύπου (chromatid type aberrations). Στην περίπτωση αυτή το χρωμόσωμα συμπεριφέρεται ως μη ενιαίο στη διάσπασή του και η ανωμαλία δε μεταβιβάζεται σε αμφότερα τα θυγατρικά κύτταρα.

Η έκθεση σε ακτινοβολία στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου προκαλεί σπάσιμο στη μια χρωματίδη του χρωμοσώματος, χωρίς σπάσιμο της αδελφής χρωματίδας ή έστω όχι στο ίδιο σημείο. Θραύσματα χρωματίδας ανάμεσα στην περιοχή που φέρει το κεντρομερίδιο και σε αυτήν που δε φέρει καλούνται χάσματα, όταν το μήκος του χάσματος είναι μεγαλύτερο από το πλάτος της χρωματίδας. <sup>[2] [20]</sup>

### 4.2 Διακύμανση της ακτινοευαισθησίας μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού και η ανάγκη εξατομίκευσης της επικινδυνότητας μιας υπερέκθεσης

Η εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης μέσω πρότυπων καμπυλών που αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, επιβεβαιώνει την υπερέκθεση, αλλά συμβάλλει και στην εκτίμηση της επικινδυνότητας της υπερέκθεσης σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Η μέθοδος όμως αυτή προϋποθέτει ότι μια συγκεκριμένη δόση ακτινοβολίας είναι εξίσου επικίνδυνη για όλα τα μέλη του πληθυσμού αδιακρίτως. Προϋποθέτει δηλαδή ότι ο ίδιος αριθμός χρωμοσωμικών αλλοιώσεων επάγεται από τη δράση αυτή σε κάθε άτομο, καθώς επίσης και ότι όλα τα μέλη του πληθυσμού εμφανίζουν την ίδια ευαισθησία σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Υπάρχουν όμως άτομα μεταξύ των μελών του πληθυσμού ιδιαίτερα ευαίσθητα στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες και χαρακτηρίζονται από αυξημένη χρωμοσωμική ακτινοευαισθησία. Η διακύμανση στην ακτινοευαισθησία μεταξύ των υγείων ατόμων μπορεί να είναι μια συνέπεια της διαφορετικής ικανότητας επισκευής του DNA λόγω συγκεκριμένων μεταλλαγών ή να οφείλεται στους πολυμορφισμούς στα γονίδια επισκευής DNA. Εναλλακτικά, μπορεί να συνδεθεί με τον κυτταρικό κύκλο και τους μηχανισμούς ελέγχου ανατροφοδότησης των κυττάρων κατά τη διάρκεια της G2 φάσης στη μετάβαση M. <sup>[11] [41]</sup>

### 4.3 Ανίχνευση ατόμων του πληθυσμού με αυξημένη ευαισθησία στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες

Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου στις οποίες το ποσοστό των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων που επάγονται από την ακτινοβολία είναι αυξημένο, είναι και οι πιο ευαίσθητες όσον αφορά την επιβίωση των κυττάρων. Η διακύμανση στην επαγωγή χρωμοσωμικών αλλοιώσεων στη G<sub>2</sub> φάση θα μπορούσε, στο πλαίσιο αξιολόγησης ενός ατυχήματος, να αποτελέσει απαραίτητο βιολογικό υπόβαθρο για την ανάπτυξη μεθοδολογίας που διαπιστώνει κατά πόσο ο εκτεθειμένος ανήκει ή όχι σε κάποια ομάδα του πληθυσμού αυξημένης ακτινοευαισθησίας. Η ετερογενής ακτινοευαισθησία της G<sub>2</sub> φάσης του κυτταρικού κύκλου έχει παρουσιαστεί και σε υγιή μέλη του πληθυσμού. Θεωρείται, επομένως, απαραίτητο για την εκτίμηση της επικινδυνότητας μιας υπερέκθεσης και την κατανόηση των μηχανισμών αυξημένης ακτινοευαισθησίας ατόμων του πληθυσμού να μελετηθούν οι παράγοντες που καθορίζουν τη χρωμοσωμική ακτινοευαισθησία.

### 4.4 Μηχανισμοί ακτινοευαισθησίας στο μοριακό και κυτταρογενετικό επίπεδο

Η γνώση των παραγόντων που καθορίζουν την ακτινοευαισθησία και ιδιαίτερα τη χρωμοσωμική, είναι δυνατόν να αποτελέσει το απαραίτητο βιολογικό υπόβαθρο για την ανάπτυξη μεθοδολογιών ώστε να εντοπίζονται μέλη του πληθυσμού που εμφανίζουν υπερευαισθησία στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Ειδικότερα σε περιπτώσεις ατυχημάτων με ιοντίζουσες ακτινοβολίες θα διαπιστώνεται κατά πόσον ο εκτεθειμένος ανήκει ή όχι σε κάποια ομάδα του πληθυσμού υψηλής επικινδυνότητας.

Καθώς τα κύτταρα επιτελούν τον κυτταρικό τους κύκλο περνώντας από τις φάσεις αυτές, η ακτινοευαισθησία τους μεταβάλλεται. Η μέση και το τέλος της συνθετικής φάσης και η G<sub>1</sub> είναι γνωστές ως «ακτινοάντοχες» φάσεις, ενώ τόσο η μίτωση όσο και οι μεταβάσεις από τη G<sub>1</sub> στην S και από τη G<sub>2</sub> στη M φάση είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην ακτινοβολία. Για την εξήγηση της διακύμανσης της ευαισθησίας καθώς και της επιμήκυνση των φάσεων G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub> που παρατηρείται μετά την επίδραση ακτινοβολίας, έχουν προταθεί διάφοροι πιθανοί μηχανισμοί. Η διακύμανση της ακτινοευαισθησίας των κυττάρων καθώς προχωρούν στον κυτταρικό τους κύκλο συνδέθηκε καταρχήν με την οργάνωση της χρωματίνης τη στιγμή της ακτινοβόλησης. Η αρχιτεκτονική δομή της χρωματίνης και του πυρήνα θεωρούνται εν γένη καθοριστικοί παράγοντες της ακτινοευαισθησίας των κυττάρων. Εντούτοις, δεν είναι δυνατόν να εξηγηθεί η αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων κατά τη μετάβασή τους από τη G<sub>1</sub> φάση στη σύνθεση (G<sub>1</sub>/S border), της G<sub>2</sub> φάσης καθώς και των κυττάρων με βραχεία G<sub>1</sub> φάση.

Μια άλλη εξήγηση βασίζεται στο ότι η ακτινοβολία προκαλεί διαφορετικό αριθμό θραυσμάτων διπλής έλικας του DNA (DNA-DSB) στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Ενώ είναι γενικά αποδεκτό ότι τα θραύσματα διπλής έλικας του DNA (DNA-DSB) οδηγούν στο σχηματισμό των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων, οι περισσότερες έρευνες έχουν αποδείξει ότι τα επίπεδα των DNA-dsb καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου είναι παρόμοια.

Οι μεταβολές στα επίπεδα των σουλφυδρικών ενώσεων κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου που χαρακτηρίζονται ως ενδογενείς ακτινοπροστατευτικές ενώσεις προσφέρουν μια άλλη πιθανή εξήγηση για τη διακύμανση της ακτινοευαισθησίας στον κυτταρικό κύκλο χωρίς όμως αυτή να είναι επαρκής.

Η επικρατέστερη ερμηνεία της διακύμανσης της ακτινοευαισθησίας στον κυτταρικό κύκλο βασίζεται στο ότι η επιδιορθωτική ικανότητα του κυττάρου είναι διαφορετική στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Είναι γενικά αποδεκτό πως τα κύτταρα αν υφίστανται την ίδια βλάβη ανά μονάδα DNA σε κάθε στιγμή του κυτταρικού τους κύκλου, η αποτελεσματικότητα των μηχανισμών επιδιόρθωσης των DNA θραύσεων είναι διαφορετική, καθορίζοντας έτσι τη διακύμανση της ακτινοευαισθησίας σε διάφορες φάσεις του κύκλου. Η επιδιορθωτική ικανότητα του κυττάρου βρέθηκε παρόμοια σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, παρά το γεγονός ότι οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις και κατά συνέπεια η επιβίωση των κυττάρων ήταν διαφορετική. <sup>[41]</sup>

#### 4.5 Σημασία καταστολής του G<sub>2</sub>/M σημείου ελέγχου

Η μέθοδος της ανάλυσης θραυσμάτων χρωματίδης αποτελεί τη βάση για τον υπολογισμό των επιδράσεων της ακτινοβολίας σε χρωμοσωμικό επίπεδο κατά τη G<sub>2</sub> φάση του κυτταρικού κύκλου. Η γνώση της G<sub>2</sub>-ακτινοευαισθησίας είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς υπάρχουν άτομα μεταξύ των μελών του πληθυσμού ιδιαίτερα ευαίσθητα στην ακτινοβολία. Αυτά τα άτομα, όπως αποδεικνύεται, έχουν την τάση για καρκινογένεση. Γνώση, λοιπόν, της ακτινοευαισθησίας θα αποτρέψει την έκθεση σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες για επαγγελματικούς ή θεραπευτικούς λόγους κι έτσι θα μειώσει την επίδραση της ακτινοβολίας σε αυτά. Επομένως, οι πληροφορίες αυτές θα μπορούσαν να αποτελέσουν την επιστημονική βάση για τον καθορισμό των μέγιστων επιτρεπτών ορίων έκθεσης και να αποδείξουν ή να τροποποιήσουν τα όρια που αποδεχόμαστε σήμερα. <sup>[2]</sup>

Ο μηχανισμός αντίστασης των κυττάρων στην ακτινοβολία ενεργοποιεί το G<sub>2</sub>/M σημείο ελέγχου και σταματά ή επιβραδύνει σημαντικά τα κύτταρα τόσο στο φυσιολογικό όσο και στον καρκινικό ιστό.



Η σκέψη, λοιπόν, για εντοπισμό ακτινοευαίσθητων ατόμων ενός πληθυσμού βασίζεται στην ανάλυση χρωμοσωμικών αλλοιώσεων, μετά από καταστολή του σημείου ελέγχου με κατάλληλους «καταργητές» του με τη μέθοδο G2-assay. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει σύγκριση μεταξύ καλλιιεργειών που έχουν υποστεί καταστολή του G2/M σημείου ελέγχου και αυτών που δεν έχουν υποστεί, ώστε να διεξαχθούν συμπεράσματα για την ακτινοευαισθησία ατόμων.

Στην παρούσα εργασία θα διερευνηθούν τα πλεονεκτήματα του συνδυασμού της ακτινοβολίας με «καταργητές» του σημείου ελέγχου G2/M για την υπέρβαση της αντοχής στην ακτινοβολία. Η καφεΐνη και η υπερθερμία είναι από τους ισχυρότερους ακτινοευαισθητοποιητές που γνωρίζουμε σήμερα και θα χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της υπόθεσης αυτής. [35]

#### 4.5.1 Η καφεΐνη ως καταστολέας του G2/M σημείου ελέγχου

Η καφεΐνη είναι ένας πολύ γνωστός αναστολέας του σημείου ελέγχου G2. Το σημείο ελέγχου G2 είναι ένας βιοχημικός μηχανισμός που ενεργοποιείται από βλάβη του DNA κατά τη διάρκεια της φάσης G2 του κυτταρικού κύκλου. Μειώνει προσωρινά την είσοδο στην μίτωση, ώστε να δοθεί χρόνος για την επιδιόρθωση του DNA και να αποτραπεί η διάδοση γενετικών ανωμαλιών. Η καφεΐνη μπορεί να εμποδίσει την είσοδο των κυττάρων στο G2 και μπορεί να παρακάμψει τη G2. Ένα σημείο ελέγχου βλάβης του DNA λειτουργεί, επίσης, στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Το σημείο ελέγχου G1 καθυστερεί την είσοδο στη φάση S για να επιτρέψει την επιδιόρθωση του DNA και να αποτρέψει την αναπαραγωγή του κατεστραμμένου DNA. Πάνω από το 60% των ανθρώπινων όγκων είναι ελαττωματικές για την πρωτεΐνη καταστολής όγκων p53, μια πρωτεΐνη απαραίτητη για το σημείο ελέγχου G1. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, τα κύτταρα p53 είναι ανίκανα να σταματούν στη G1 μετά από βλάβη του DNA. Ωστόσο, το σημείο ελέγχου G2, αν και μειωμένο, εξακολουθεί να τους παρέχει την ευκαιρία να επιδιορθώσουν τις βλάβες του DNA και να συνεχίσουν να διαιρούνται.

Οι παράγοντες που καταστρέφουν το DNA αποτελούν τη μείζονα κατηγορία θεραπειών για τον καρκίνο. Σημαντικό ενδιαφέρον έχει προκύψει στην πιθανή χρήση των αναστολέων σημείων ελέγχου G2 ως μέσου ενίσχυσης της ευαισθησίας των κυττάρων όγκου p53 σε θεραπευτικές αγωγές που καταστρέφουν το DNA. Οι αναστολείς θα πρέπει να έχουν μικρή επίδραση στην επιβίωση των φυσιολογικών κυττάρων, καθώς τέτοια κύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν το σημείο ελέγχου G1 και το σημείο ελέγχου G2 είναι ισχυρό. Ωστόσο, οι αναστολείς θα πρέπει να αυξήσουν τη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων p53, δεδομένου ότι τώρα θα

προχωρήσουν σε μίτωση με υπερβολική βλάβη στο DNA, ένα θανατηφόρο συμβάν. <sup>[1] [4] [5] [8] [11] [24]</sup>

#### 4.5.2 Η υπερθερμία ως καταστολέας του G<sub>2</sub>/M σημείου ελέγχου

Υπερθερμία είναι η διαδικασία της αύξησης της θερμοκρασίας σε ένα μέρος του σώματος ή σε ολόκληρο το σώμα πάνω από το φυσιολογικό για ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα, εφαρμόζεται μόνη της ή ως συμπληρωματική θεραπεία με διάφορες καθιερωμένες μεθόδους θεραπείας του καρκίνου, όπως η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία.

Θερμική αντοχή ονομάζεται η ικανότητα των κυττάρων να αντέχουν σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από την κανονική θερμοκρασία λειτουργίας τους.

Στην υπερθερμία μετά το θερμικό σοκ, όλοι οι τύποι κυττάρων παρουσιάζουν αυξημένη θερμοαντοχή για 24-48 ώρες. Η ανάπτυξη θερμοαντοχής συνοδεύεται από τη σύνθεση μιας σειράς πρωτεϊνών που αναφέρονται ως πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs). Αυτά τα μόρια είναι αντικείμενο έντονης μελέτης, λόγω της σημασίας τους στην κανονική λειτουργία των κυττάρων και σε διάφορες νοσηρές καταστάσεις. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες, συμβαίνει αναστολή της HSP-συνθέσεως η οποία οδηγεί το καρκινικό κύτταρο σε εκθετικό θάνατο.

Η αύξηση της θερμοκρασίας του όγκου στους 42,5°C και πάνω μειώνει το ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό pH, το οποίο μπορεί να ευαισθητοποιήσει περαιτέρω τα καρκινικά κύτταρα. Σχετικοί παθογόνοι μηχανισμοί που οδηγούν σε οξέωση (μη φυσιολογικές συνθήκες που προκύπτουν από την περίσσεια οξέος μέσα στο αίμα) μετά από την θερμική επεξεργασία (η οποία είναι αναστρέψιμη μετά την υπερθερμία είναι :

1. αυξημένος ρυθμός γλυκόλυσης με τη συσσώρευση του γαλακτικού οξέος
2. εντατικοποίηση υδρόλυσης ATP
3. αυξημένη κετογένεση με τη συσσώρευση του ακετοξικού οξέος και B-υδροξυβουτυρικό οξύ
4. αύξηση CO<sub>2</sub>
5. αλλαγές στη χημική ισορροπία των ενδο- και εξω-κυτταρικών συστημάτων ρύθμισης
6. αναστολή του Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> στη μεμβράνη του κυττάρου.

Ο κυτταρικός θάνατος που μπορεί να προκαλέσει η υπερθερμία εμφανίζεται να έχει εξάρτηση με τη φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα κύτταρα στις φάσεις S και M υποβάλλονται σε μια «αργή λειτουργία του κυτταρικού θανάτου» μετά από

υπερθερμία. Τα κύτταρα κατά τη διάρκεια της G<sub>1</sub> φάσης ακολουθούν μια «ταχεία λειτουργία του θανάτου» αμέσως μετά την υπερθερμία.

Συνοπτικά, σε κύτταρα που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία, νεοσυσταθείσα θραύσματα DNA εμφανίζονται να ενώνονται λάθος και να περιέχουν ανώμαλες χρωματίδες. Στη συνέχεια αυτά τα κύτταρα καταστρέφονται μετά τη φάση της μίτωσης. Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης επηρεάζονται, επίσης, από υπερθερμία οδηγώντας σε μεταλλαξιογόνες επιδράσεις. Η σύνθεση του rRNA καταστρέφεται επίσης λόγω θέρμανσης, καθώς καταστρέφεται ένα ένζυμο που εμπλέκεται στη σύνθεση του. <sup>[21] [20] [43]</sup>

#### 4.6 Σημασία μελέτης της ακτινοευαισθησίας

Η γνώση των παραγόντων που καθορίζουν την ακτινοευαισθησία αποτελεί απαραίτητο βιολογικό υπόβαθρο για την ανάπτυξη μεθοδολογίας, ώστε να εντοπίζονται μέλη του πληθυσμού με υπερευαισθησία στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Για την κατανόηση των παραγόντων που καθορίζουν τη διακύμανση της ακτινοευαισθησίας μεταξύ ατόμων του πληθυσμού, θεωρήθηκε απαραίτητη η μελέτη των μηχανισμών που διέπουν τη διακύμανση της ακτινοευαισθησίας στο κυτταρογενετικό επίπεδο και ιδιαίτερα στις διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Η αυξημένη ευαισθησία σχετίζεται με την παρουσία μεταλλαγμένων γονιδίων και αυξάνονται καθημερινά οι ενδείξεις για κληρονομική μεταβίβαση. Επίσης, η εκδήλωση αυξημένης ακτινοευαισθησίας ενδεχομένως να μην είναι αποτέλεσμα μετάλλαξης ενός μόνο γονιδίου, αλλά συνεργίας πολλών. Επομένως, η άμεση ανίχνευση των γονιδίων που προδιαθέτουν αυξημένη ακτινοευαισθησία είναι ακόμα πιο δύσκολη.

Εναλλακτικές λύσεις αποτελούν οι επιγονιδιακές εκφράσεις και συνεπαγόμενα φαινόμενα στο μοριακό, χρωμοσωμικό ή κυτταρικό επίπεδο, μετά από έκθεση σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Μια από τις ενδείξεις αυτές αποτελεί η αποτελεσματικότητα επεξεργασίας και μετατροπής των βλαβών που επάγονται στο DNA που αξιολογείται πχ με βάση τις εναπομένουσες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις μετά από ακτινοβολήση στη G<sub>2</sub> φάση του κυτταρικού κύκλου.

Τα φαινόμενα φωσφοριλίωσης και συμπύκνωσης της χρωματίνης καθώς το κύτταρο προετοιμάζεται για τη μιτωτική διαίρεση λαμβάνουν χώρα ως επί τω πλείστων κατά τη διάρκεια της G<sub>2</sub> φάσης του κυτταρικού κύκλου και πιθανότατα εξηγούν την αυξημένη ενδογενή ακτινοευαισθησία της φάσης αυτής. Μια από τις ενδείξεις, λοιπόν, της αυξημένης ακτινοευαισθησίας του ατόμου αποτελεί η μη αποτελεσματική επεξεργασία των βλαβών που επάγονται στο DNA μετά την

ακτινοβολήση της G<sub>2</sub> φάσης που αξιολογείται με τις εναπομένουσες χρωματιδικές αλλοιώσεις στη μετάφαση.

Στόχος της εργασίας είναι η ανίχνευση της διαφορετικής ακτινοευαισθησίας μέσω υπολογισμού των θραυσμάτων χρωματίδης, μεταξύ δοτών και η ταξινόμησή τους με βάση την ευαισθησία της G<sub>2</sub> φάσης των λεμφοκυττάρων τους μετά από ακτινοβολήση με ιοντίζουσα ακτινοβολία.<sup>[26]</sup>

## 5. Το μικροσκόπιο



Εικόνα 6.4.1.1 Οπτικό μικροσκόπιο

Το μικροσκόπιο αποτέλεσε ένα από τα μεγαλύτερα επιτεύγματα της επιστήμης (εφεύρεση μικροσκοπίου: Leeuwenhoek 1670), καθώς επιτρέπει την μετατροπή ενός αντικειμένου σε είδωλο πολύ μεγαλύτερο του αρχικού αντικειμένου, δηλαδή τη μεγέθυνση. Ειδικά σε τομείς της ιατρικής αποτέλεσε καταλύτη σε μελέτες ποικίλων τομέων.

Το οπτικό (ή κοινό) μικροσκόπιο χρησιμοποιεί για τη δημιουργία του ειδώλου ορατό φως. Η μεγέθυνση που μπορεί να επιτευχθεί περιορίζεται από το μήκος κύματος του ορατού φάσματος (~400-700nm), το μικρότερο δηλαδή αντικείμενο που μπορεί να δει κανείς με ένα οπτικό μικροσκόπιο είναι διαμέτρου περίπου 1μm. Τα κύτταρα είναι περίπου 5-50μm διαμέτρου, οπότε μπορούν να μελετηθούν με ένα τέτοιο μικροσκόπιο.

### 5.1 Τα μέρη του μικροσκοπίου

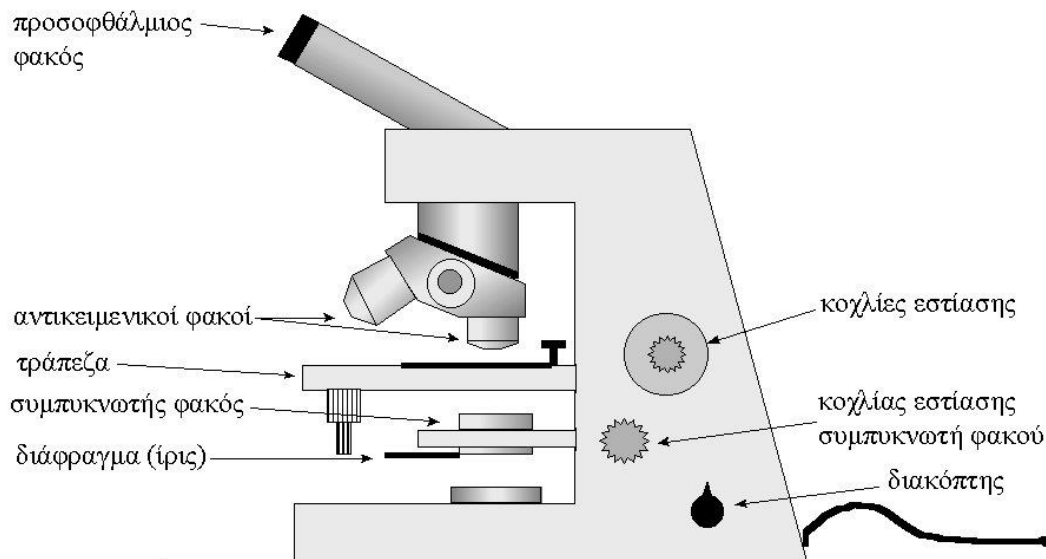
Το οπτικό μικροσκόπιο αποτελείται από τρεις συγκλίνοντες φακούς: το συλλέκτη, τον αντικειμενικό και τον προσοφθάλμιο.

Ο συλλέκτης χρησιμοποιείται για να συγκεντρώνει το φως που εκπέμπει η πηγή πάνω στο αντικείμενο, δηλαδή να το φωτίζει.

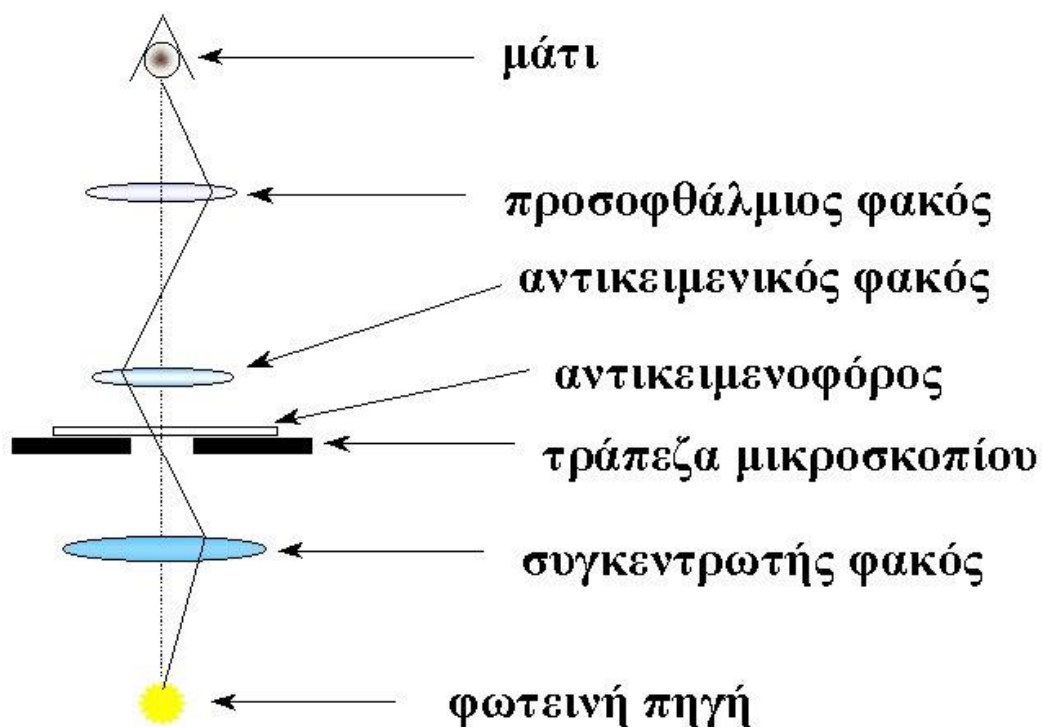
Ο αντικειμενικός δημιουργεί το πρώτο είδωλο. Σχηματίζει ανεστραμμένο το είδωλο  $A'B'$  του αντικειμένου  $AB$  με μεγέθυνση  $m_1 = \frac{A'B'}{AB}$ .

Ο προσοφθάλμιος μεγεθύνει το είδωλο που έχει δημιουργήσει ο αντικειμενικός. Σχηματίζει το ανεστραμμένο είδωλο  $A''B''$  του ειδώλου  $A'B'$  με μεγέθυνση  $m_2 = \frac{A''B''}{A'B'}$ .

Άρα το τελικό είδωλο  $A''B''$  δεν είναι ανεστραμμένο και έχει μεγεθυνθεί σε σχέση με το αρχικό αντικείμενο  $AB$  κατά συνολική μεγέθυνση  $m = m_1 \times m_2 = \frac{A''B''}{AB}$ .<sup>[37]</sup>



Εικόνα 6.4.1.2 Οπτικό μικροσκόπιο, Πηγή: [www.aua.gr](http://www.aua.gr)



Εικόνα 6.4.1.3 Οπτικό μικροσκόπιο, Πηγή: [www.aua.gr](http://www.aua.gr)

## 5.2 Σημαντικά μεγέθη

Ένα μέγεθος που μας ενδιαφέρει ιδιαίτερα να μελετάμε στο μικροσκόπιο είναι η μεγέθυνση  $N$  του μικροσκοπίου και δίνεται από τη σχέση:

$$N = P \cdot \delta = \frac{I \cdot \delta}{\varphi_{\pi} \cdot \varphi_{\alpha}}$$

όπου  $I$  είναι η απόσταση μεταξύ των δύο φακών,  $\varphi_{\pi}$  η εστιακή απόσταση του προσοφθάλμιου φακού,  $\varphi_{\alpha}$  η εστιακή απόσταση του αντικειμενικού φακού και  $\delta$  η απόσταση ευκρινούς όρασης, που είναι συνήθως ίση με 25cm.

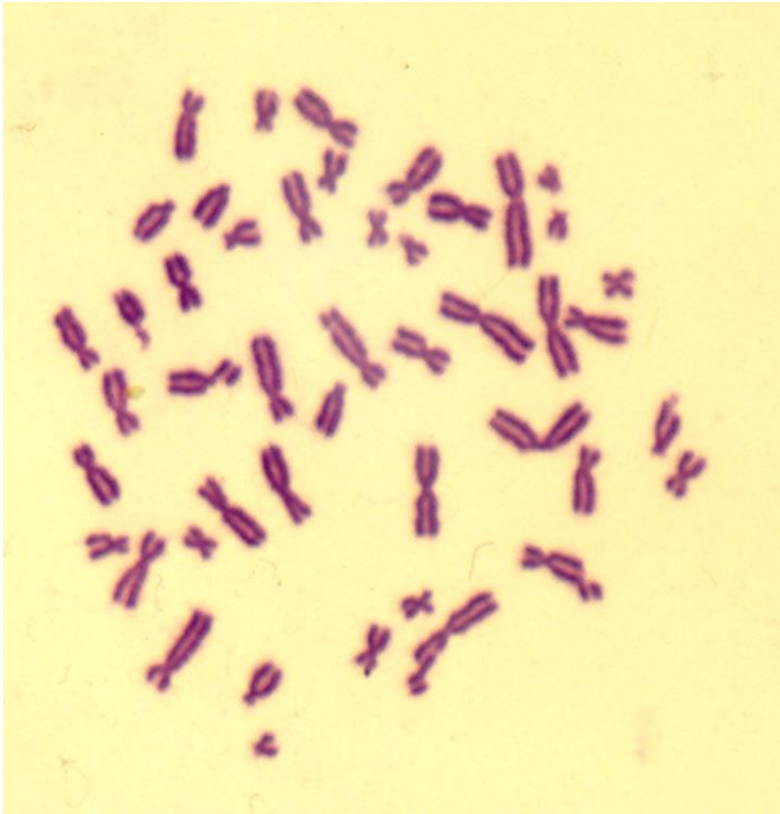
Ένα άλλο ενδιαφέρον μέγεθος είναι το διακριτικό όριο, που δίνεται από τη σχέση:

$$R = 0.61 \frac{\lambda}{A}$$

όπου  $\lambda$  είναι το μήκος κύματος του χρησιμοποιούμενου φωτός στο κενό και  $A$  το αριθμητικό άνοιγμα του φακού.

Για να πετύχουμε ικανοποιητικό διακριτικό όριο χρησιμοποιήσαμε καταδυτικό φακό και κοδρέλαιο (υλικό με δείκτη διάθλασης 1,5). Τα αντικείμενα που μπορούν να παρατηρηθούν με το οπτικό μικροσκόπιο μπορούν να είναι διαμέτρου 1-60μm περίπου, έτσι ώστε να είναι δυνατός ο φωτισμός τους. Επειδή τα πιο πολλά κύτταρα είναι διαφανή στο φως, δε διακρίνονται, οπότε γι αυτό χρωματίζονται.

Η ανάλυση των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων γίνεται σε μικροσκόπιο Nikon Microphot - FXA. Για τον έλεγχο της G2 χρωμοσωμικής ακτινοευαισθησίας λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος χρησιμοποιήσαμε το σύστημα IKAROS (Metasystems), έτσι ώστε να αναλυθούν, να αποθηκευτούν και να ταξινομηθούν τα αποτελέσματα που αφορούν αλλοιώσεις τύπου χρωματίδης. <sup>[37]</sup>



Χρωματιδικές αλλοιώσεις μετά από ακτινοβόληση με 1 Gy στη G<sub>2</sub> φάση του κυτταρικού κύκλου



## 6. Πειραματικό μέρος

Η ταυτοποίηση των ασθενών που είναι ευαίσθητοι ή ανθεκτικοί στην ακτινοβολία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως χρήσιμο εργαλείο για το σχεδιασμό της θεραπείας και το μέγεθος της χορηγούμενης δόσης ακτινοβολίας, θα μπορούσε δε να αποτελέσει την επιστημονική βάση για το σχεδιασμό θεραπείας και τον επανακαθορισμό των ορίων δόσεων στην ακτινοθεραπευτική ογκολογία.

Μετά από ακτινοβόληση και προκειμένου τα κύτταρα να εξασφαλίσουν μια ακριβή και τέλεια μίτωση υπόκεινται σε πολλαπλά σημεία ελέγχου που βρίσκονται σε διάφορα χρονικά σημεία του κυτταρικού κύκλου και που επιτρέπουν τη συνέχιση του κύκλου ή τον αναστέλλουν. Η βλάβη του DNA προκαλεί ενεργοποίηση της κινάσης  $chk1 \rightarrow$  φωσφορυλίωση του  $cdc25$ , γεγονός απαραίτητο για την ενεργοποίηση του συμπλέγματος  $cyclinB/CDK1 \rightarrow$  αναχαίτηση του κυτταρικού κύκλου. Η ενεργοποίηση της διαδικασίας αυτής αποτελεί κριτικής σημασίας παράγοντα της ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων προς την ιοντίζουσα ακτινοβολία. Ένας σημαντικός μηχανισμός αντίστασης των κυττάρων στην ακτινοβολία ενεργοποιεί το G2/M σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και τον αναχαιτίζει<sup>[34]</sup>. Στην παρούσα διατριβή, θα μελετήσουμε την ενδογενή ακτινοευαισθησία βάσει χρωματιδικών αλλοιώσεων και τα πλεονεκτήματα του συνδυασμού της ακτινοβολίας με «καταργητές» (καφεΐνη και υπερθερμία) του σημείου ελέγχου G2/M για την υπέρβαση της αντοχής του όγκου στην ακτινοβολία με χρήση της μεθόδου G2-assay. Η μέθοδος του G2 assay θα αναλυθεί παρακάτω απαιτεί εν συντομία:

- Καλλιέργεια λεμφοκυττάρων περιφερειακού αίματος και αποδιαφοροποίησή τους με φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA) για 72 ώρες
- Ακτινοβόληση των κυττάρων
- Χωρισμός της κάθε καλλιέργειας σε τρεις, όπου η μια από αυτές δέχεται προσθήκη της χημικής ουσίας καφεΐνης, η άλλη υπερθερμία στους 41°C, ώστε να επιτευχθεί η απενεργοποίηση του G2/M σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, ενώ η τρίτη δε δέχεται καμία προσθήκη
- Επώαση για 20min
- Προσθήκη κολσεμιδίου και επώαση για 60min
- Προετοιμασία και αξιολόγηση των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων
- Τελικά τον υπολογισμό της συχνότητας των χρωμοσωμικών θραυσμάτων για την εκτίμηση του Ατομικού Δείκτη Ακτινοευαισθησίας IRS)

## 6.1 Συνθήκες ακτινοβόλησης

Η ακτινοβόληση των δειγμάτων γίνεται με ακτινοβολητή κοβαλτίου ( $^{60}\text{Co}$ ) GammaCell 220 Irradiator (Atomic Energy of Canada Ltd, Ottawa, Canada, Ιανουάριος 1974, ενεργότητας 5470 Ci) σε θερμοκρασία δωματίου και με ρυθμό δόσης 1 Gy/min για 6min. Της ακτινοβόλησης προηγείται μέτρηση του ρυθμού δόσης με τη βοήθεια φορητού δοσίμετρου, που τοποθετούμε ακριβώς στο σημείο που θα τοποθετηθούν τα δείγματα.

Το Κοβάλτιο (Cobaltum) είναι μέταλλο με ατομικό αριθμό 27 και ατομικό βάρος 58,93. Έχει θερμοκρασία τήξης 1.495 °C και θερμοκρασία βρασμού 2.870 °C. Το μόνο σταθερό ισότοπο κοβαλτίου είναι το  $^{59}\text{Co}$ . Το  $^{60}\text{Co}$ , ένα τεχνητά παραγόμενο ραδιενεργό ισότοπο του κοβαλτίου, αποτελεί σημαντικό ραδιενεργό «ανιχνευτή» και βοηθό στη θεραπεία του καρκίνου. Το  $^{60}\text{Co}$  χρησιμοποιείται στην αποστείρωση του ιατρικού εξοπλισμού και ορισμένων καταναλωτικών προϊόντων, στις θεραπευτικές ακτινοβολίες για τη θεραπεία ασθενών με καρκίνο, στην κατασκευή πλαστικών και στην ακτινοβόληση των τροφίμων. Το  $^{57}\text{Co}$  χρησιμοποιείται στην ιατρική και στην έρευνα. Μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί 22 ραδιοϊσότοπα κοβαλτίου και τα πιο σταθερά από αυτά είναι τα  $^{60}\text{Co}$  με διάρκεια ημιζωής 5,3 έτη,  $^{56}\text{Co}$  με διάρκεια ημιζωής 77,27 μέρες και  $^{58}\text{Co}$  με διάρκεια ημιζωής 70,86 μέρες. Όλα τα υπόλοιπα ραδιενεργά ισότοπα έχουν διάρκεια ημιζωής μικρότερη από 18 ώρες και η πλειοψηφία τους μικρότερη του ενός δευτερολέπτου.

## 6.2 Προετοιμασία δειγμάτων αίματος

Με στόχο την ανίχνευση στις ακτινοευαισθησίας ατόμων σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες μελετήθηκε η ακτινοευαισθησία των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος ασθενών στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου.

Η λήψη δείγματος περιφερικού ολικού αίματος γίνεται με σύριγγες, που περιέχουν ηπαρίνη αραιωμένη σε φυσιολογικό ορό (η ηπαρίνη είναι απαραίτητη για να αποφευχθεί η πήξη του αίματος).

Για κάθε καλλιέργεια χρησιμοποιούνται 0,5ml περιφερικού αίματος, 5ml θρεπτικού υλικού, Mc Coy's 5A medium, που περιέχει 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου (F.C.S.), 1% γλουταμίνη (Glu), 1% αντιβιοτικά (P.S.). Στο τέλος προστίθεται 2% φυτοαιμαγλουτινίνη (P.H.A.). Ο FCS παρέχει τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες για τα κύτταρα. Τα αντιβιοτικά, όπως η πενικιλίνη, η στρεπτομυκίνη, δρουν ανασταλτικά στις τυχόν μολύνσεις, ενώ η γλουταμίνη ως αμινοξύ δρα σαν

βοηθητικός παράγοντας για τις διάφορες κυτταρικές διεργασίες. Η φυτοαιμαγλουτινίνη είναι αναγκαία για την αποδιαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων και την επιτέλεση του κυτταρικού τους κύκλου, δηλαδή κάνει τα λεμφοκύτταρα να πολλαπλασιάζονται, δεδομένου του ότι σε συνθήκες τα λεμφοκύτταρα στο περιφερειακό αίμα δεν πολλαπλασιάζονται.

Το δείγμα αίματος και το θρεπτικό υλικό τοποθετούνται σε σωλήνες καλλιέργειας με αποστειρωμένες πιπέτες, έτσι ώστε να είναι ακριβής η δοσολογία, αλλά και για να αποφευχθούν μολύνσεις. Το πείραμα γίνεται σε τράπεζα στείρου αέρα κατακόρυφης ροής.

Οι σωλήνες καλλιέργειας, έπειτα, τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο σε γωνία 30°, ώστε να υπάρχει κλίση και να μην επικάθονται όλα τα κύτταρα στον πάτο του σωλήνα καλλιέργειας. Το περιβάλλον στον κλίβανο είναι 95% αέρα, 5% CO<sub>2</sub>, 100% υγρασία και θερμοκρασία στους 37°. Η συγκεκριμένη θερμοκρασία είναι απαραίτητη για την επιτάχυνση των κυττάρων στον κυτταρικό τους κύκλο, ενώ το 5% CO<sub>2</sub> στον αέρα απαιτείται για τη διατήρηση του pH μεταξύ 6,8 και 7,2 ώστε να είναι εφικτή η ανάπτυξη των κυττάρων. Τα κύτταρα παραμένουν στον κλίβανο για 48h. Το χρονικό διάστημα αυτό απαιτείται για να προχωρήσουν τα κύτταρα, μετά την αποδιαφοροποίησή τους, στη G<sub>2</sub> φάση του κυτταρικού κύκλου. Όταν ολοκληρωθεί αυτός ο χρόνος, βάζουμε στις καλλιέργειες καινούργιο θρεπτικό υλικό και ακτινοβολούμε τις καλλιέργειες κρατώντας παράλληλα και κάποιες καλλιέργειες-μάρτυρες (control) χωρίς ακτινοβολήση.

Η ακτινοβολήση γίνεται με κοβάλτιο (<sup>60</sup>Co) GammaCell 220 Irradiator (Atomic Energy of Canada Ltd, Ottawa, Canada, Ιανουάριος 1974, ενεργότητας 5470 Ci) σε θερμοκρασία δωματίου και με ρυθμό δόσης 1 Gy/min. Οι σωλήνες καλλιέργειας τοποθετούνται στην πηγή κοβαλτίου σε ειδική υποδοχή και ακτινοβολούνται για 1min. Απομακρύνουμε ύστερα τους σωλήνες καλλιέργειας. Επιλέγουμε τη δόση των 1 Gy, επειδή μας δίνει αρκετά ικανοποιητικό αριθμό μεταφάσεων.

Μετά την ακτινοβολήση, γίνεται χωρισμός της κάθε καλλιέργειας σε τρεις, όπου η μία εκ των οποίων δέχεται επίδραση της χημικής ουσίας καφεΐνης, η άλλη υπερθερμία στους 41 βαθμούς Κελσίου ώστε να επιτευχθεί η απενεργοποίηση της δράσης του G<sub>2</sub> σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, ενώ η τρίτη δεν δέχεται προσθήκη της χημικής ουσίας καφεΐνης, ώστε να υπάρχει αναστολή του G<sub>2</sub> σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.

Οι καλλιέργειες παραμένουν για 20min στον επωαστικό κλίβανο, ώστε τα κύτταρα που είναι στη μίτωση και αυτά που είναι στο τέλος της G<sub>2</sub> φάσης του κυτταρικού κύκλου να μιτωθούν και να συνεχίσουν τον κυτταρικό τους κύκλο. Στα κύτταρα που ακτινοβολούνται ενώ είναι ήδη στη μίτωση, επειδή έχει ήδη φωσφορυλιωθεί και συμπυκνωθεί η χρωματίνη τους, δε θα είναι ορατές οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις. Αφήνουμε, επομένως, να περάσει αυτό το χρονικό

διάστημα μετά την ακτινοβολήση, ώστε να πάρουμε τα κύτταρα που θα περάσουν στη φάση της μίτωσης και φωσφορυλίωσης και συμπύκνωσης της χρωματίδας τους. Έπειτα, προσθέτουμε στις καλλιέργειες με μια πιπέτα 0,6ml κολσεμίδιο (Colcemid) για 60min, ώστε τα αποδιαφοροποιημένα από τη φυτοαιμαγλουτινίνη λεμφοκύτταρα να διακόψουν τον κυτταρικό τους κύκλο και να συσσωρευτούν στη μετάφαση. Αμέσως μετά γίνεται η διακοπή της καλλιέργειας των δειγμάτων και προετοιμάζονται τα χρωμοσωμικά παρασκευάσματα.

#### 6.4 Προετοιμασία χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων

Στις καλλιέργειες των κυττάρων του περιφερικού αίματος προσθέτουμε 10ml υπότονου διαλύματος KCl 0.075M για 10min σε θερμοκρασία δωματίου έτσι ώστε στο διάστημα αυτό τα κύτταρα να διογκωθούν. Αυτό συμβαίνει γιατί το διάλυμα που βάζουμε, ως υπότονο, έχει χαμηλότερη τιμή ωσμωτικής πίεσης σε σχέση με το εσωτερικό του κυττάρου. Για να επιτευχθεί η εξίσωση των πιέσεων εντός κι εκτός κυττάρου, αυτό λαμβάνει νερό με τη βοήθεια της ημιπερατής μεμβράνης και το κύτταρο διογκώνεται χωρίς να διαρραγεί η μεμβράνη του και ταυτόχρονα τα χρωμοσώματά του απλώνονται και γίνονται ορατά σχεδόν χωρίς το ένα να επικαλύπτει το άλλο. Στη συνέχεια, τοποθετούμε τις καλλιέργειες στη διάταξη φυγοκέντρισης για 10min στις 1300 στροφές/min. Αποχύνουμε το υπερκείμενο διάλυμα και αφήνουμε περίπου 0,5ml, στα οποία επαναιωρούνται τα κύτταρα.

Ακολουθεί η διαδικασία μονιμοποίησης, η οποία είναι απαραίτητη για να σταθεροποιηθούν τα διογκωμένα κύτταρα, Ο μονιμοποιητής (fixative) αποτελείται από μεθανόλη και οξικό οξύ με αναλογία 3:1 v/v. Στα κύτταρα που έχουν απομείνει στο αιώρημα προσθέτουμε 100ml μονιμοποιητή, στην αρχή σταγόνα-σταγόνα και αναδεύοντας με ελαφρές κινήσεις το σωλήνα καλλιέργειας και μετά με μεγαλύτερες ποσότητες και αναδεύοντας.

Τα μονιμοποιημένα κύτταρα τοποθετούνται για φυγοκέντρωση (1200 στροφές/min) για 10min. Αποχύνουμε πάλι το υπερκείμενο αφήνοντας περίπου 0,5ml και ακολουθεί η διαδικασία μονιμοποίησης για ακόμα δύο φορές. Συνολικά εκτελούμε τη διαδικασία μονιμοποίησης τρεις φορές. Μετά από την τελευταία φορά, και αφού αποχύσουμε το υπερκείμενο, «πλένουμε» τα κύτταρα με 6ml φρέσκο μονιμοποιητή και τέλος επαναιωρούνται σε διάλυμα 0,3-0,6ml.

Εν συνεχεία, τα κύτταρα στρώνονται σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Αν υπάρχει χρόνος, αφήνουμε τα κύτταρα 24h με τον μονιμοποιητή πριν τα στρώσουμε. Με τη βοήθεια μιας πιπέτας παίρνουμε τα κύτταρα από τους σωλήνες καλλιέργειας στάλα-στάλα, τα τοποθετούμε πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες, στις οποίες πριν έχουμε δημιουργήσει με τη βοήθεια μιας υγρής χαρτοπετσέτας ένα λεπτό

στρώμα (φιλμ) νερού. Αναγράφεται η ημερομηνία παρασκευής τους και ο κωδικός καλλιέργειας στην οποία αντιστοιχούν πάνω στις πλάκες.

Η ποιότητα των παρασκευασμάτων ελέγχεται με φωτεινό μικροσκόπιο αντίθετης φάση και στη συνέχεια οι πλάκες βάζονται. Σε δοχείο χρώσης ειδικής κατασκευής με υποδοχές για να τοποθετούνται οι πλάκες προστίθενται 2ml χρωστικής Giemsa σε περίπου 50ml ρυθμιστικού διαλύματος Sorensen. Για να φτιάξουμε το ρυθμιστικό Sorensen's phosphate buffer με  $\text{pH}=6,8$  στους  $20^{\circ}\text{C}$  αναμιγνύουμε 50ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  συγκέντρωσης 1:15  $M=0,06M$  και 50ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  συγκέντρωσης 1:15  $M=0,06M$ . Για το βάψιμο των πλακών τοποθετούμε αυτές μέσα στο ειδικό δοχείο και περιμένουμε 10min για να βαφτούν. Κατόπιν τις πλένουμε σε νερό βρύσης και τις αφήνουμε να στεγνώσουν σε συνθήκες δωματίου.

Για να προστατεύσουμε τα παρασκευάσματα επικολλάμε καλυπτρίδες. Τις επικολλάμε πάνω στις πλάκες με Entelan medium, έτσι ώστε όταν έρθει σε επαφή η πλάκα με το φακό του μικροσκοπίου, να μην καταστραφούν τα κύτταρα που υπάρχουν πάνω στην πλάκα.

## 6.5 Ανάλυση στο οπτικό μικροσκόπιο

Αφού ετοιμάστηκαν οι πλάκες, ακολουθεί ανάλυση με το οπτικό μικροσκόπιο. Τα παρασκευάσματα εξετάζονται στο οπτικό μικροσκόπιο ως προς τις αλλοιώσεις τύπου χρωματίδης και συνήθως είναι θραύσματα ή χάσματα. Οι ασυνέχειες που καταγράφονται είναι αυτές που είναι μεγαλύτερες από το πάχος της χρωματίδης.

Η ανάλυση έχει στόχο τον υπολογισμό της συχνότητας των χρωματιδικών θραυσμάτων (chromatics breaks/cells) για την εκτίμηση του Ατομικού Δείκτη Ακτινοευαισθησίας (IRS), όπου  $\text{IRS}=(G_2/G_2+\text{caf})\cdot 100\%$ . Στη συνέχεια βάσει πρότυπου ιστογράμματος (Γράφημα) του Εργαστηρίου Υγιοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής του Ινστιτούτου Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» (Pantelias and Terzoudi 2011) εκτιμάται η ενδογενής ακτινοευαισθησία του εκτιθέμενου.<sup>[41]</sup>

## 7. Αποτελέσματα

Παράδειγμα: Πίνακας καταγραφής αριθμού χρωμοσωμικών αλλοιώσεων από δύο δείγματα του ίδιου ασθενούς με νεοπλασία

	G1 A	G1 B	G1+caf A	G1+caf B	G1+hyp A	G1+hyp B
1	2	14	10	11	25	21
2	7	4	7	17	18	23
3	2	6	8	14	19	17
4	2	6	18	18	34	22
5	4	9	19	13	11	15
6	12	14	14	9	12	25
7	3	18	9	20	31	16
8	3	13	29	7	27	20
9	1	30	21	11	15	5
10	8	19	15	9	8	3
11	1	16	21	12	25	11
12	9	3	13	16	19	19
13	10	0	16	16	10	19
14	2	10	12	15	13	26
15	12	3	17	11	4	19
16	27	15	11	19	11	20
17	2	3	20	5	13	15
18	6	1	12	15	24	15
19	1	5	17	18	11	11
20	10	5	16	11	24	8
21	7	1	14	12	20	14
22	18	0	14	12	22	7
23	3	7	19	21	20	13
24	1	0	21	17	10	19
25	12	1	12	15	13	29
26	7	4	16	5	27	17
27	28	1	10	15	18	27
28	0	7	19	14	19	11
29	18	19	11	13	22	18
30	16	20	7	16	17	10
Total/πλακάκι	234	254	448	407	542	495
Yield/πλακάκι	7,80	8,47	14,93	13,57	18,07	16,50
Yield	8,13		14,25		17,28	

Στο παραπάνω φύλλο μετρήσεων υπολογίστηκε ο αριθμός θραυσμάτων στις χρωματίδες ανά κύτταρο. Αναλύσαμε συνολικά τουλάχιστον 60 μεταφάσεις για κάθε δότη και υπολογίσαμε το μέσο όρο των χρωματιδικών αλλοιώσεων ανά κύτταρο. Ο Ατομικός Δείκτης Ακτινοευαισθησίας (IRS) υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:  $IRSc = (G2/G2caf) * 100\%$  και οι δότες κατανεμήθηκαν ως προς την ακτινοευαισθησία που εμφάνισαν, όπως θα δείξουμε στην παράγραφο 7.4.

Παρακάτω εμφανίζονται τρεις εικόνες από το μικροσκόπιο ως καταγραφησθείσες για τη συμπλήρωση των μετρήσεων θραυσμάτων χρωματίδης των μεταφάσεων.



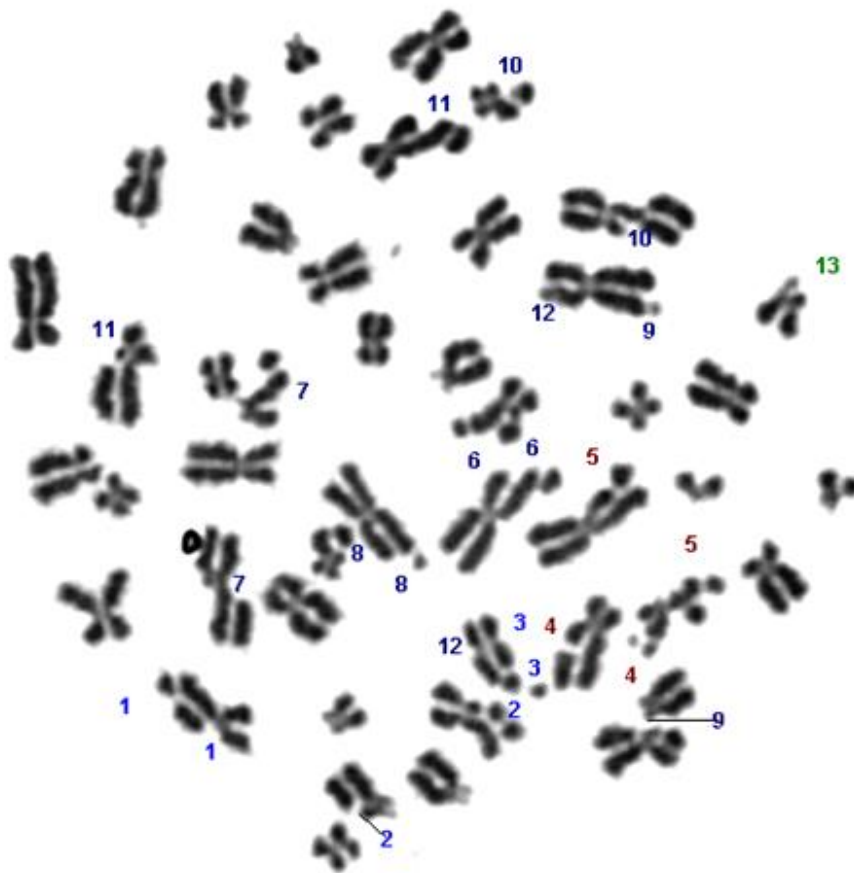
Χρωμοσωμικές αλλοιώσεις δότη μετά από ακτινοβολήση με 1 Gy. Στην εικόνα φαίνονται αριθμημένα 9 θραύσματα χρωματίδης.



Χρωμοσωμικές αλλοιώσεις δότη μετά από ακτινοβολήση με 1 Gy σε συνδυασμό με καφεΐνη.

Στην εικόνα φαίνονται αριθμημένα 13 θραύσματα χρωματίδας.





Χρωμοσωμικές αλλοιώσεις δότη μετά από ακτινοβολήση με 1 Gy σε συνδυασμό με υπερθερμία.

Στην εικόνα φαίνονται αριθμημένα 28 θραύσματα χρωματίδας.

## 7.1 Αξιολόγηση επίδρασης αναστολέων του G<sub>2</sub>/M σημείου ελέγχου

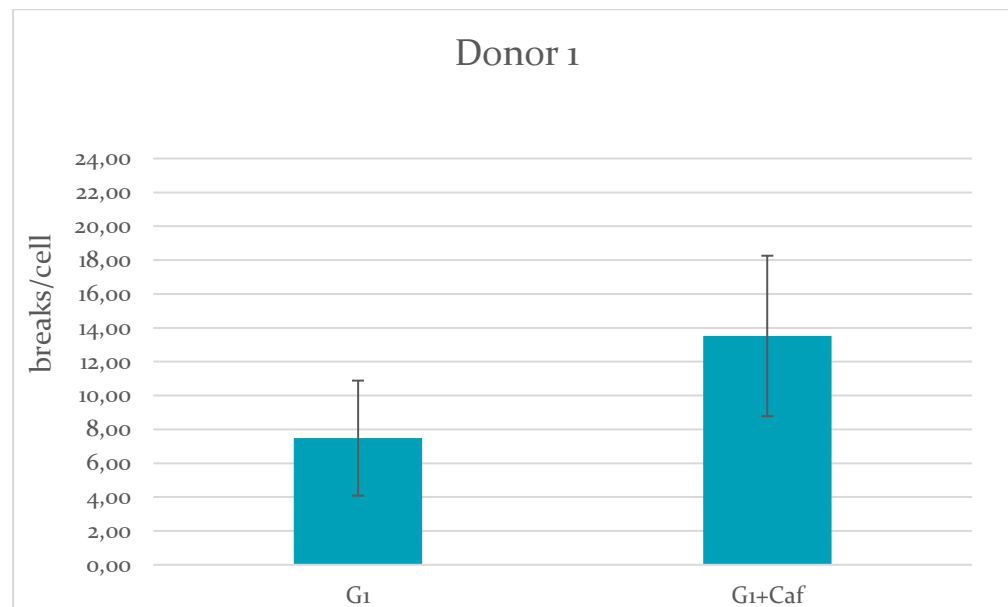
Για τη διερεύνηση των πλεονεκτημάτων του συνδυασμού της ακτινοβολίας με αναστολείς σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου για την υπέρβαση της αντοχής του όγκου στην ακτινοβολία καθώς και των εμπλεκόμενων μηχανισμών χρησιμοποιήσαμε ως ακτινοευαίσθητοποιητές την καφεΐνη και την υπερθερμία.

Στα γραφήματα εισήχθη σφάλμα με βάση την τυπική απόκλιση.

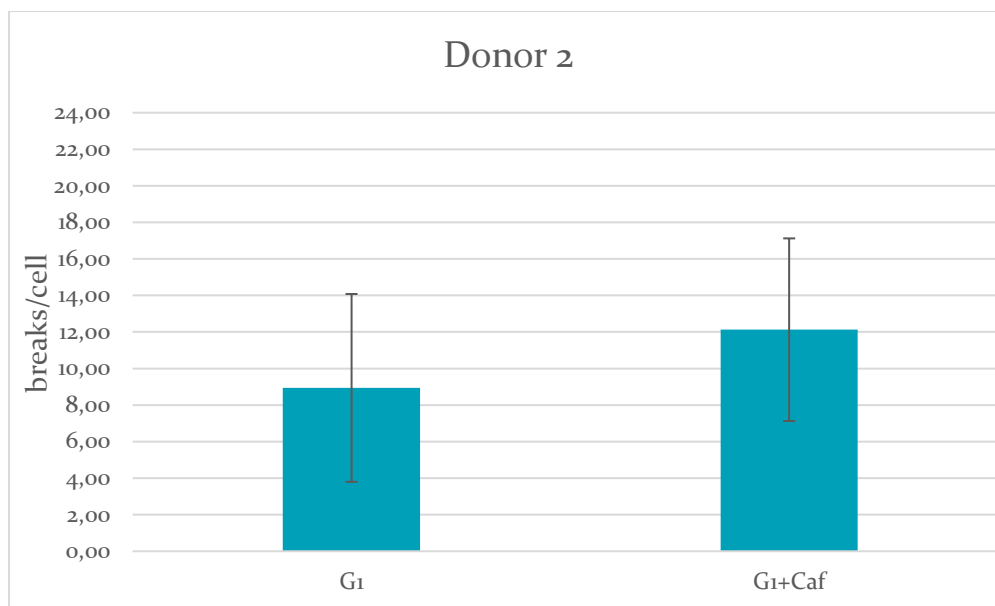
Πίνακας 7.1.1 Πίνακας μέσου όρου θραυσμάτων ανά κύτταρο υγιών δοτών και ασθενών με σύνδρομα με προδιάθεση στον καρκίνο.

	G1	G1+Caf	G1+Hyp
<b>Donor 1</b>	7,48	13,52	-
<b>Donor 2</b>	8,94	12,13	-
<b>Donor 3</b>	8,87	13,98	-
<b>Donor 4</b>	10,08	18,43	20,88
<b>Donor 5</b>	10,77	18,88	21,05
<b>Donor 6</b>	8,58	18,08	18,55
<b>Donor 7</b>	8,88	19,51	-

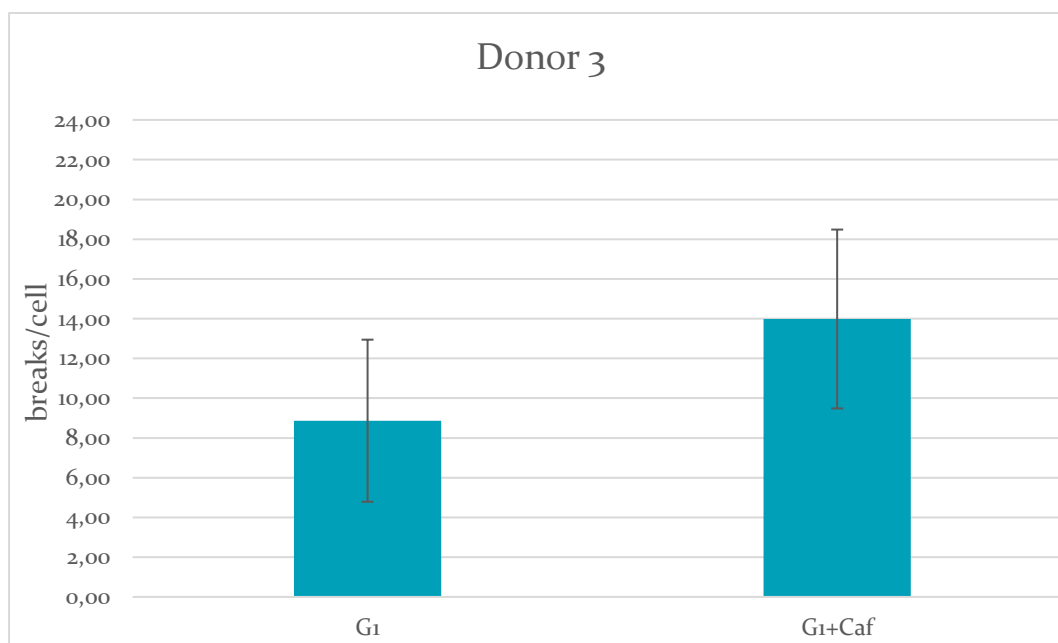
Ακολουθεί γραφική αναπαράσταση των θραυσμάτων ανά κύτταρο για τα απλά ακτινοβολημένα δείγματα, για τα ακτινοβολημένα δείγματα με προσθήκη καφεΐνης και τα ακτινοβολημένα δείγματα που υποβλήθηκαν σε υπερθερμία για κάθε έναν από τους επτά δότες.



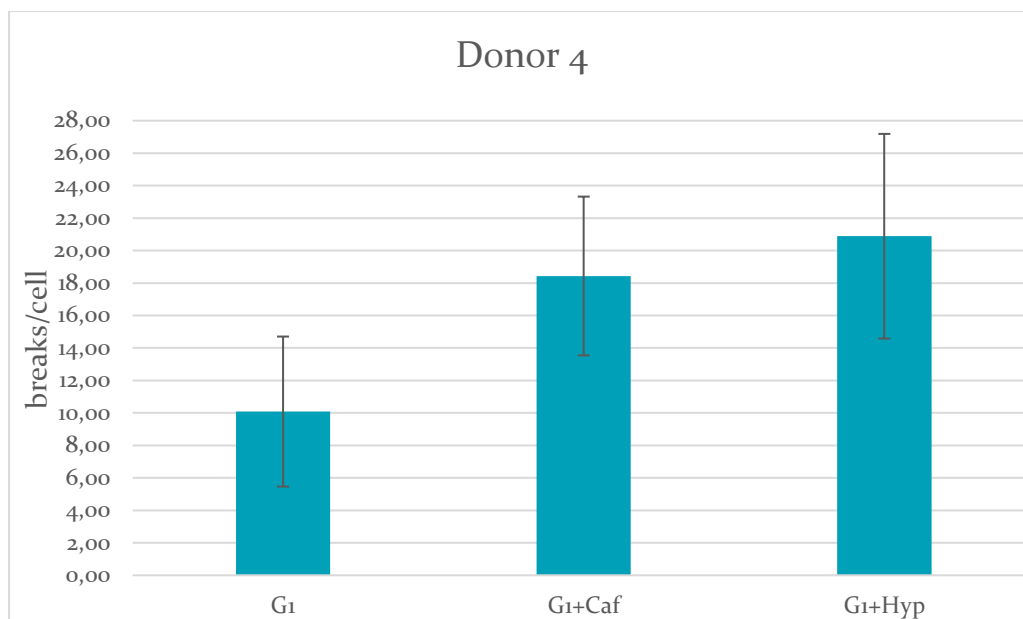
Γράφημα 7.1.1 Θραύσματα ανά κύτταρο σε απλό ακτινοβολημένο δείγμα και σε δείγμα με προσθήκη καφεΐνης για το δότη 1.



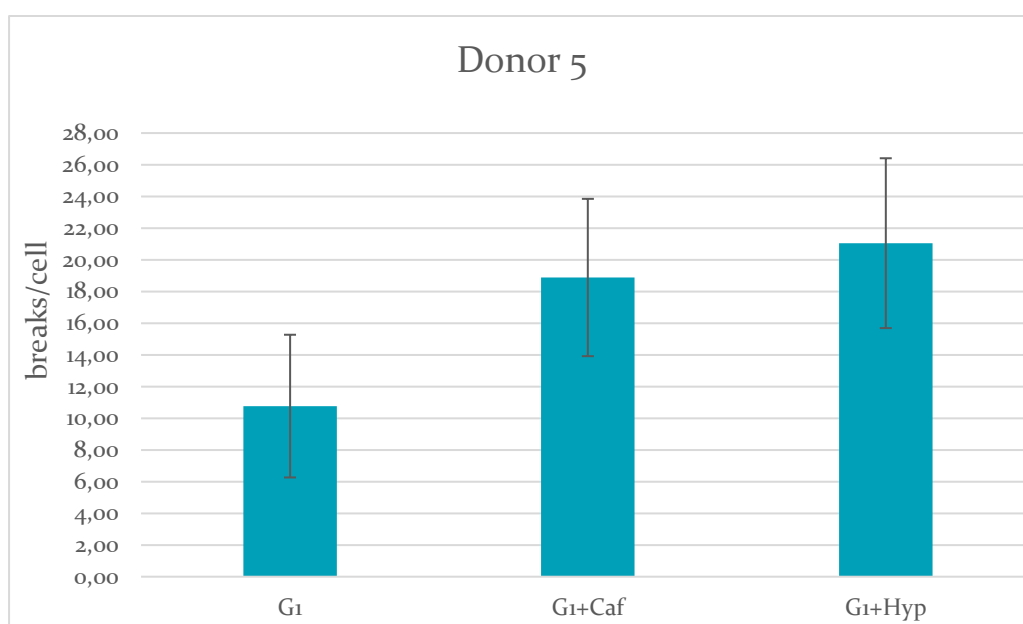
Γράφημα 7.1.2 Θραύσματα ανά κύτταρο σε απλό ακτινοβολημένο δείγμα και σε δείγμα με προσθήκη καφεΐνης για το δότη 2.



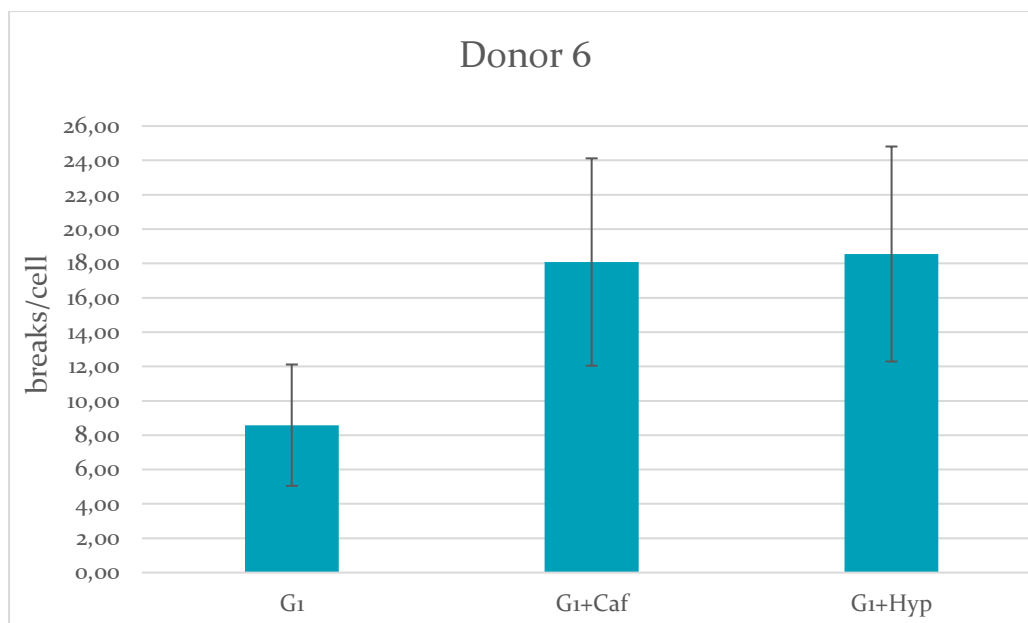
Γράφημα 7.1.3 Θραύσματα ανά κύτταρο σε απλό ακτινοβολημένο δείγμα και σε δείγμα με προσθήκη καφεΐνης για το δότη 3.



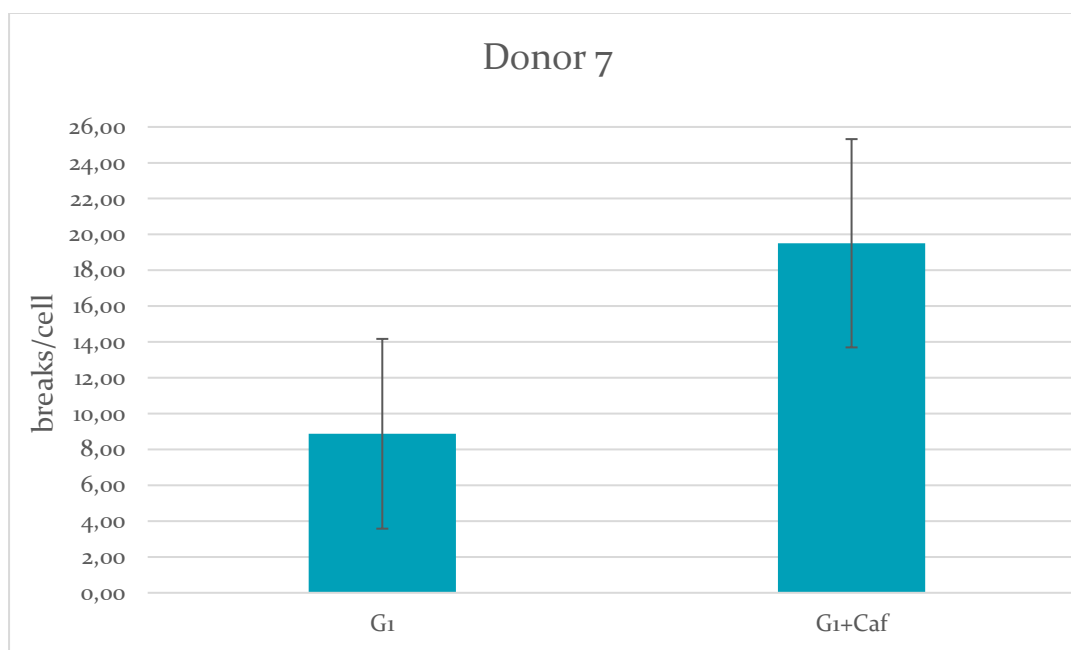
Γράφημα 7.1.4 Θραύσματα ανά κύτταρο σε απλό ακτινοβολημένο δείγμα, σε δείγμα με προσθήκη καφεΐνης και σε δείγμα με υπερθερμία για το δότη 4.



Γράφημα 7.1.5 Θραύσματα ανά κύτταρο σε απλό ακτινοβολημένο δείγμα, σε δείγμα με προσθήκη καφεΐνης και σε δείγμα με υπερθερμία για το δότη 5.



Γράφημα 7.1.6 Θραύσματα ανά κύτταρο σε απλό ακτινοβολημένο δείγμα, σε δείγμα με προσθήκη καφεΐνης και σε δείγμα με υπερθερμία για το δότη 6.

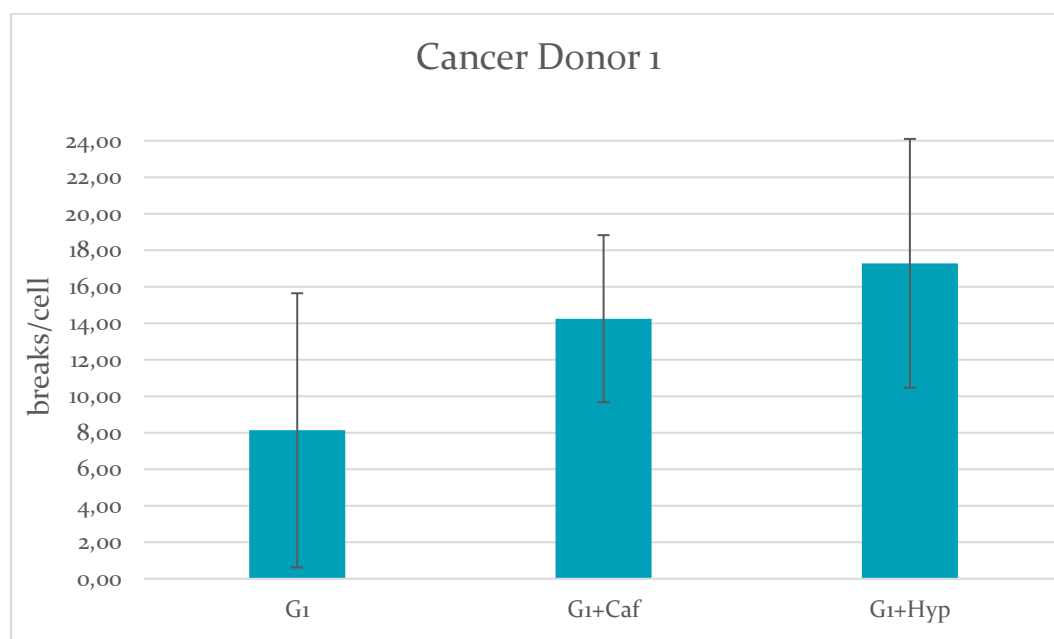


Γράφημα 7.1.7 Θραύσματα ανά κύτταρο σε απλό ακτινοβολημένο δείγμα και σε δείγμα με προσθήκη καφεΐνης για το δότη 7.

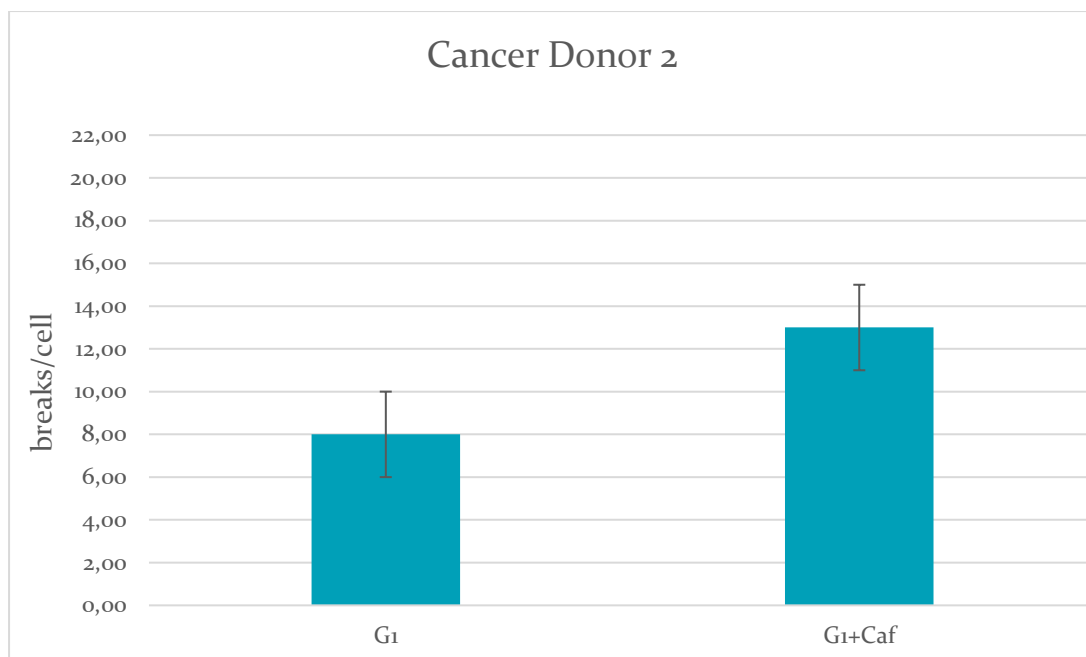
Πίνακας 7.1.2 Πίνακας μέσου όρου θραυσμάτων ανά κύτταρο για ασθενείς με νεοπλασίες.

	G1	G1+Caf	G1+Hyp
<b>Cancer Patient 1</b>	8,13	14,25	17,28
<b>Cancer Patient 2</b>	8	13	-
<b>Cancer Patient 3</b>	7,7	11,7	-
<b>Cancer Patient 4</b>	5,6	11,3	-
<b>Cancer Patient 5</b>	5	9,3	-
<b>Cancer Patient 6</b>	6	12	-

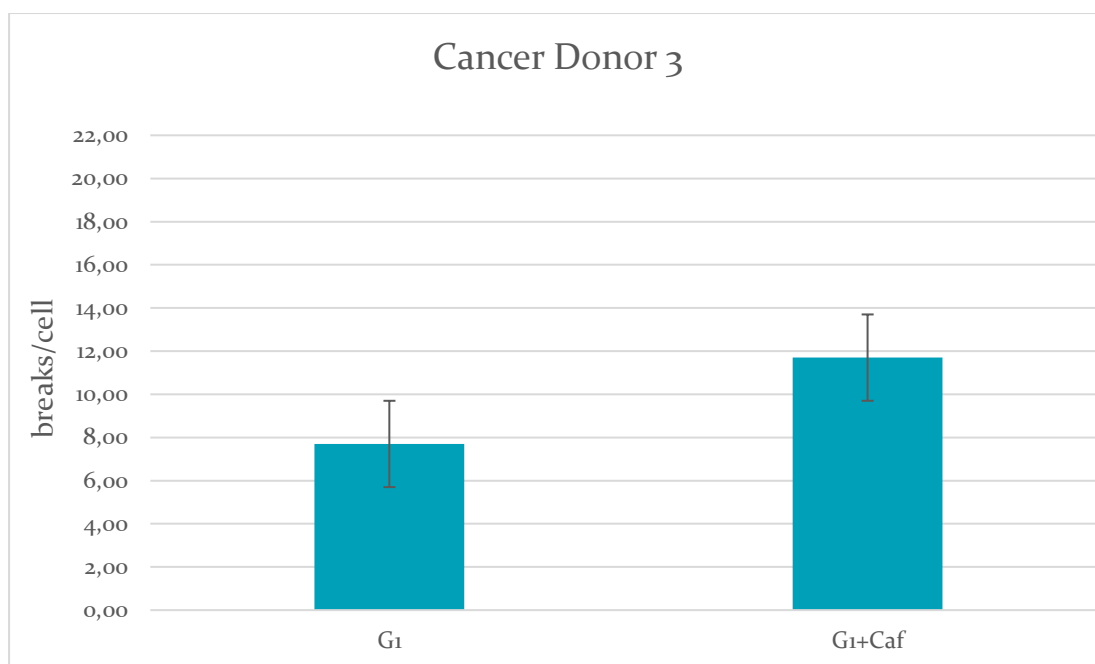
Ακολουθεί γραφική αναπαράσταση των θραυσμάτων ανά κύτταρο για τα απλά ακτινοβολημένα δείγματα, για τα ακτινοβολημένα δείγματα με προσθήκη καφεΐνης και τα ακτινοβολημένα δείγματα που υποβλήθηκαν σε υπερθερμία για κάθε έναν από τους ασθενείς με νεοπλασίες.



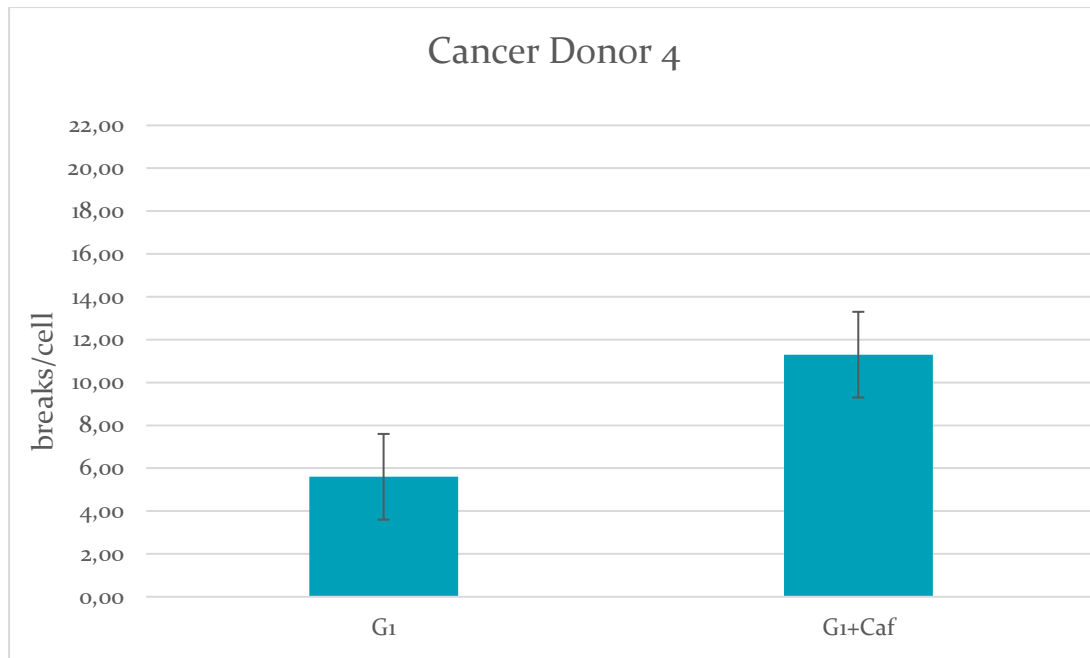
Γράφημα 7.1.8 Θραύσματα ανά κύτταρο σε απλό ακτινοβολημένο δείγμα, σε δείγμα με προσθήκη καφεΐνης και σε δείγμα με υπερθερμία για τον ασθενή 1.



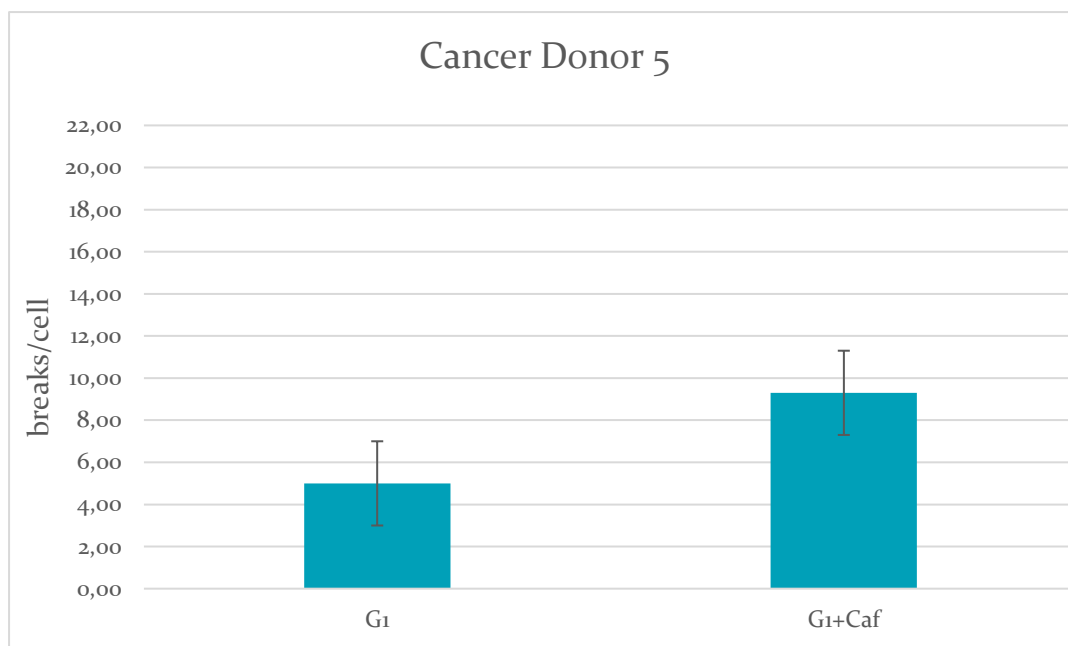
Γράφημα 7.1.9 Θραύσματα ανά κύτταρο σε απλό ακτινοβολημένο δείγμα και σε δείγμα με προσθήκη καφεΐνης για τον ασθενή 2.



Γράφημα 7.1.10 Θραύσματα ανά κύτταρο σε απλό ακτινοβολημένο δείγμα και σε δείγμα με προσθήκη καφεΐνης για τον ασθενή 3.

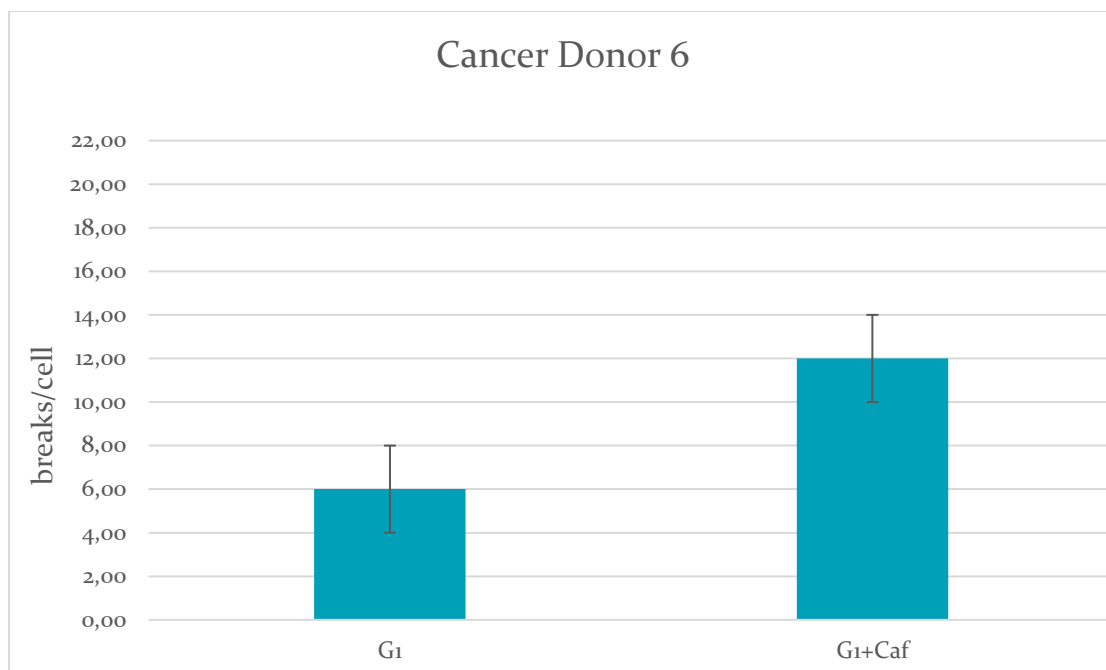


Γράφημα 7.1.11 Θραύσματα ανά κύτταρο σε απλό ακτινοβολημένο δείγμα και σε δείγμα με προσθήκη καφεΐνης για τον ασθενή 4.



Γράφημα 7.1.12 Θραύσματα ανά κύτταρο σε απλό ακτινοβολημένο δείγμα και σε δείγμα με προσθήκη καφεΐνης για τον ασθενή 5.





Γράφημα 7.1.13 Θραύσματα ανά κύτταρο σε απλό ακτινοβολημένο δείγμα και σε δείγμα με προσθήκη καφεΐνης για τον ασθενή 6.

## 7.2 Σύγκριση μεταξύ ατόμων του πληθυσμού

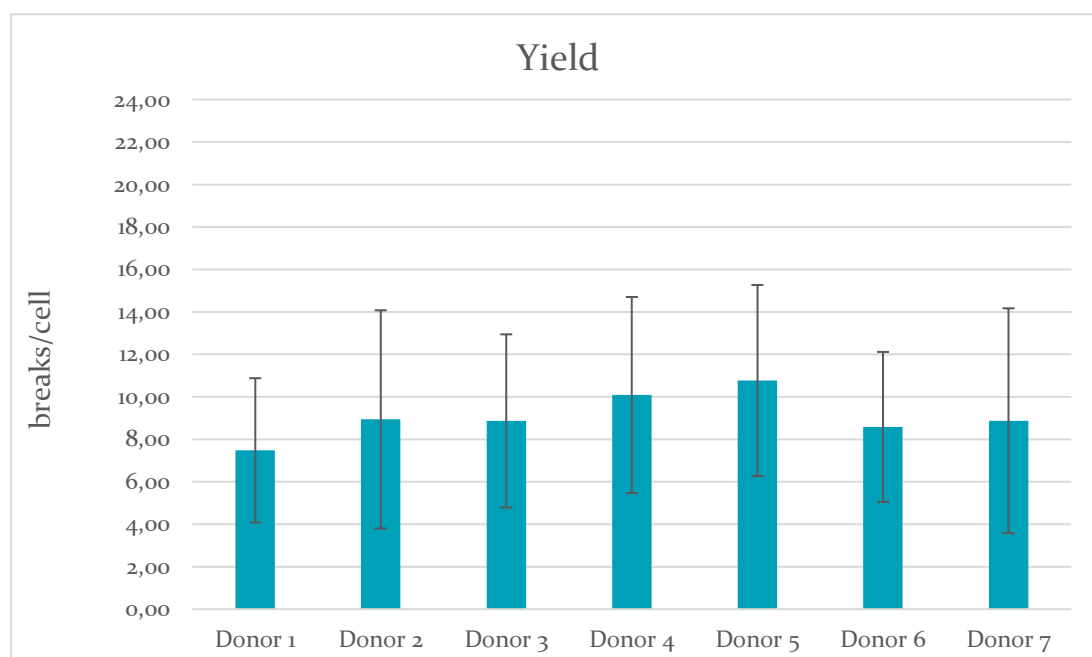
Ακολουθούν πίνακες και διαγράμματα με τα αποτελέσματα του υπολογισμού του αριθμού χρωματιδικών αλλοιώσεων και του δείκτη ατομικής ακτινοευαισθησίας για όλους τους δότες, σύμφωνα με τα οποία κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα που θα παρατίθενται στη συνέχεια.

Πίνακας 7.2.1 Πίνακας μέσων όρων θραυσμάτων/κύτταρο και Ατομικού Δείκτη Ακτινοευαισθησίας (IRS) για ασθενείς με σύνδρομο προδιάθεσης στον καρκίνο και υγιείς δότες,.

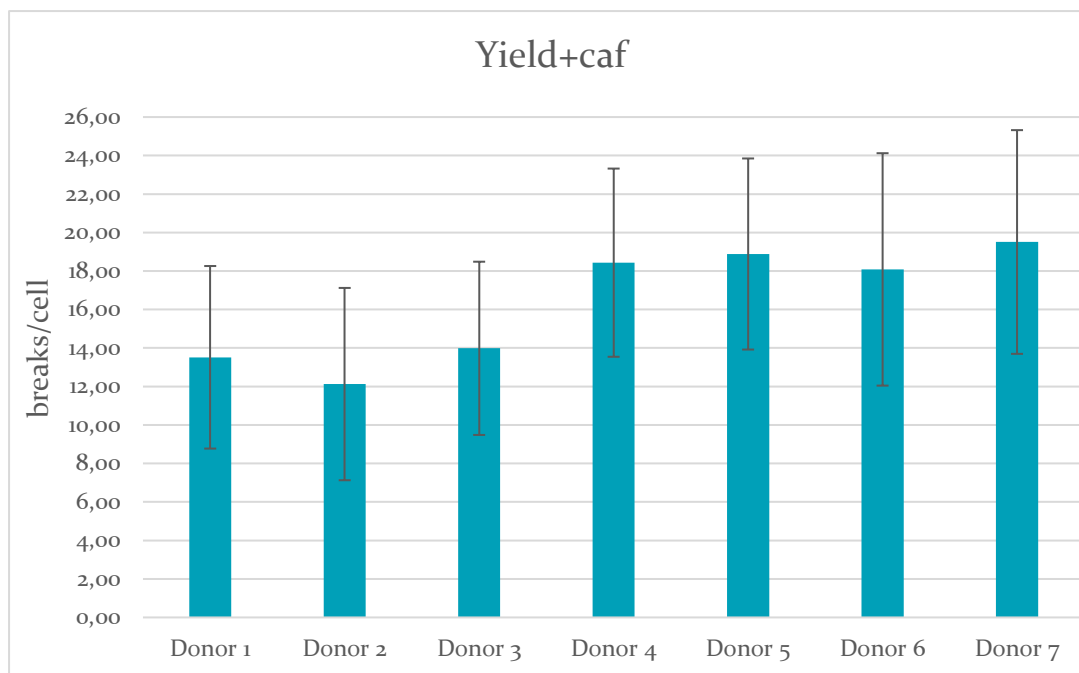
	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 4	Donor 5	Donor 6	Donor 7
Yield	7,48	8,94	8,87	10,08	10,77	8,58	8,88
Yield (+caf)	13,52	12,13	13,98	18,43	18,88	18,08	19,51
Yield (+hyp)	-	-	-	20,88	21,05	18,55	-
IRS <sub>caf</sub>	55,41	73,45	64,24	53,16	57,02	47,67	47,98
IRS <sub>hyp</sub>	-	-	-	43,74	51,16	44,86	-

Στη συνέχεια παρατίθενται τα διαγράμματα απλών ακτινοβολημένων δειγμάτων, ακτινοβολημένων δειγμάτων με προσθήκη καφεΐνης και ακτινοβολημένων δειγμάτων που υπεβλήθησαν σε υπερθερμία, για όλους τους δότες.

Στο γράφημα παρατηρούμε πως ο μέσος όρος θραυσμάτων ανά κύτταρο δεν αποκλίνει από το αναμενόμενο που είναι 8-10 θραύσματα/κύτταρο.



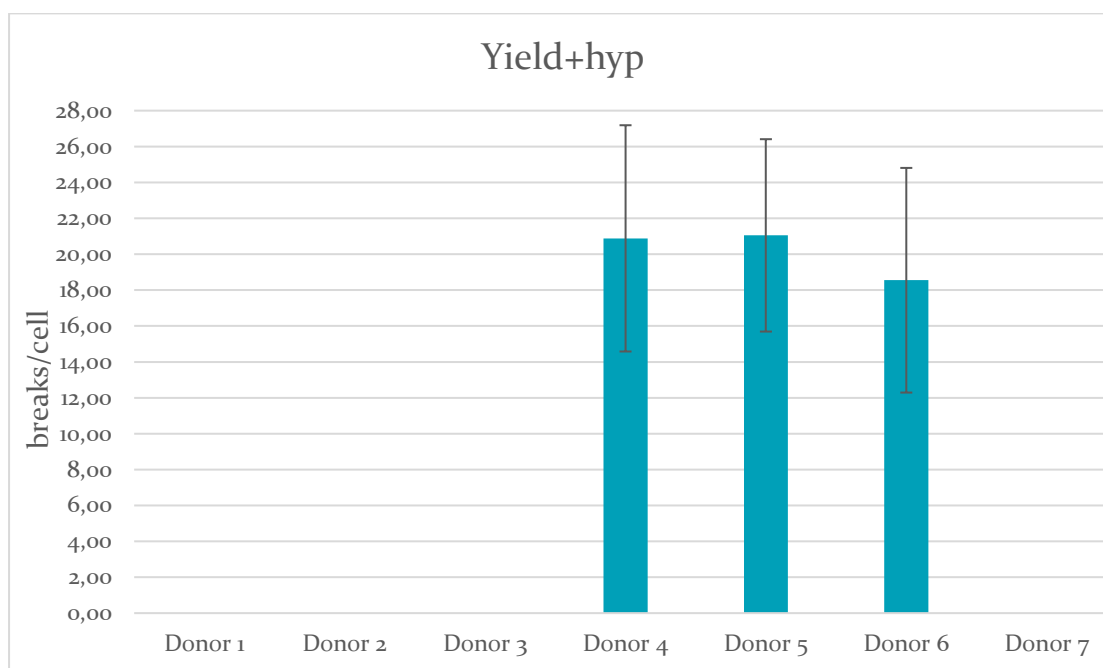
Γράφημα 7.2.1 Γραφική αναπαράσταση μέσου όρου θραυσμάτων ανά κύτταρο υγιών δοτών και ασθενών με σύνδρομο προδιάθεσης στον καρκίνο



Στο παραπάνω γράφημα ο μέσος όρος χρωματιδικών αλλοιώσεων ανά κύτταρο

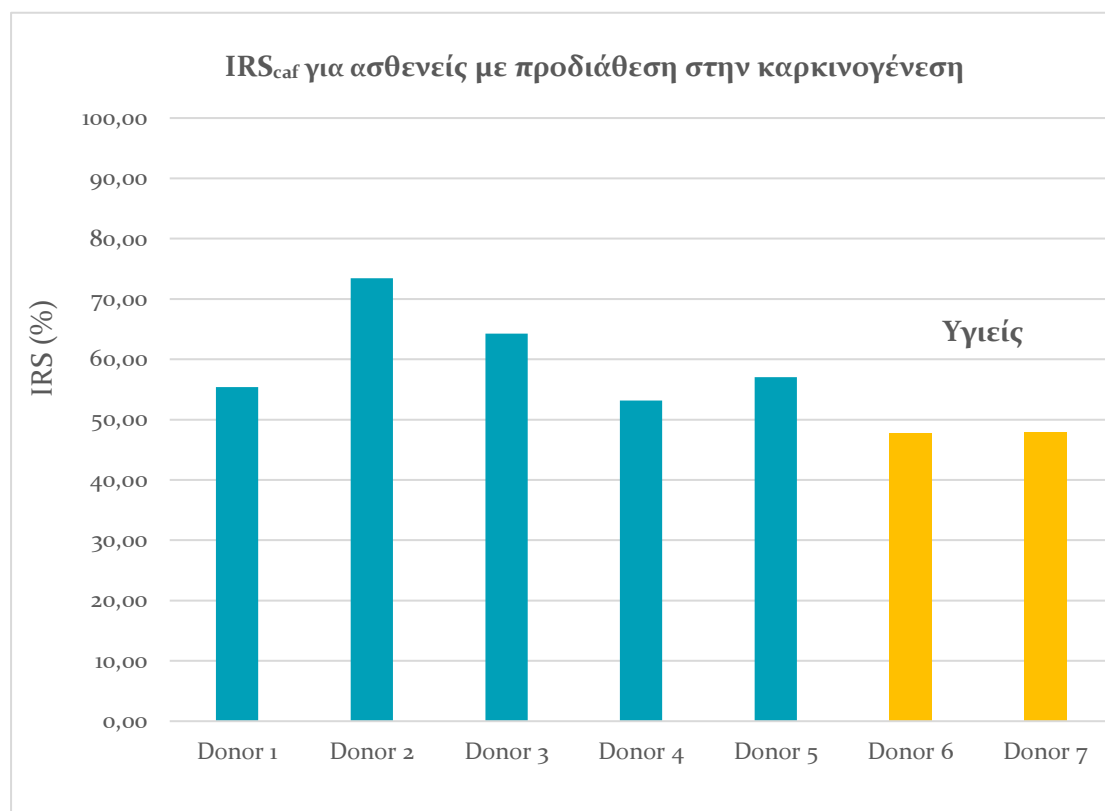
*Γράφημα 7.2.2 Γραφική αναπαράσταση μέσου όρου θραυσμάτων ανά κύτταρο για κάθε δότη σε καλλιέργειες με προσθήκη καφεΐνης.*

αυξάνεται ραγδαία με την προσθήκη καφεΐνης. Μεταξύ των δοτών βλέπουμε μια διακύμανση του μέσου όρου μεταξύ 12 και 20 θραυσμάτων ανά κύτταρο.



*Γράφημα 7.2.3 Γραφική αναπαράσταση μέσου όρου θραυσμάτων ανά κύτταρο για κάθε δότη σε καλλιέργειες που έχουν υποβληθεί σε υπερθερμία.*

Με τη χρήση υπερθερμίας, ο αριθμός των χρωμοσωμικών σχεδόν διπλασιάστηκε σε σχέση με τα απλά ακτινοβολημένα δείγματα.

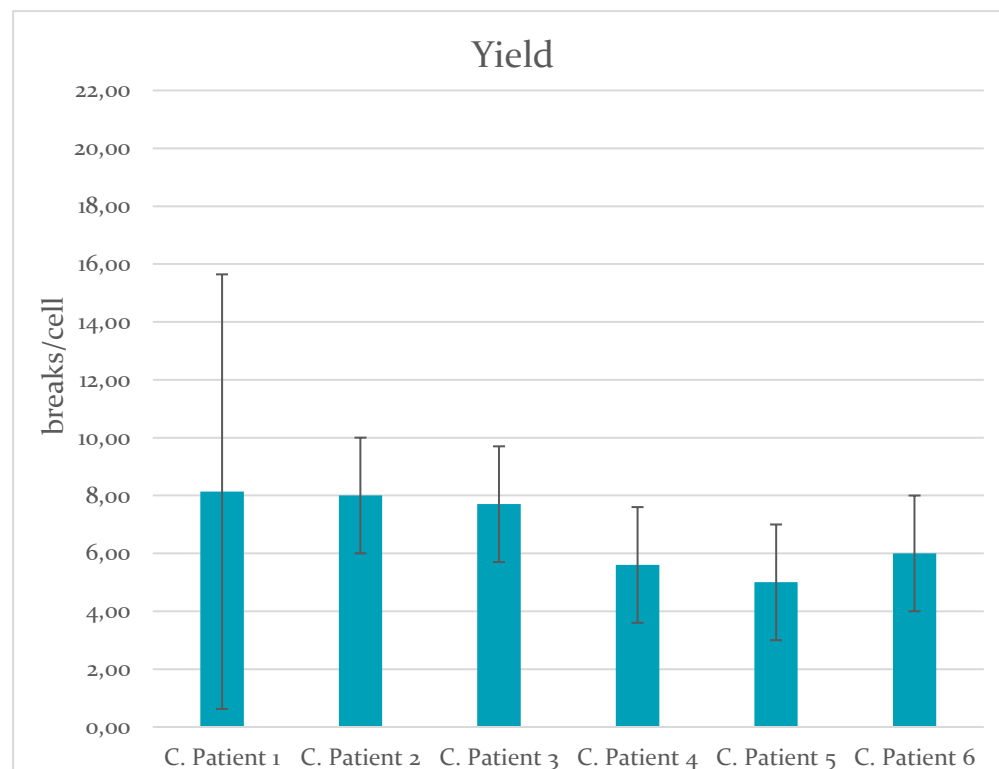


Γράφημα 7.2.4 Διακύμανση ατομικής ακτινοευαισθησίας ασθενών με προδιάθεση στην καρκινογένεση και υγιών ατόμων.

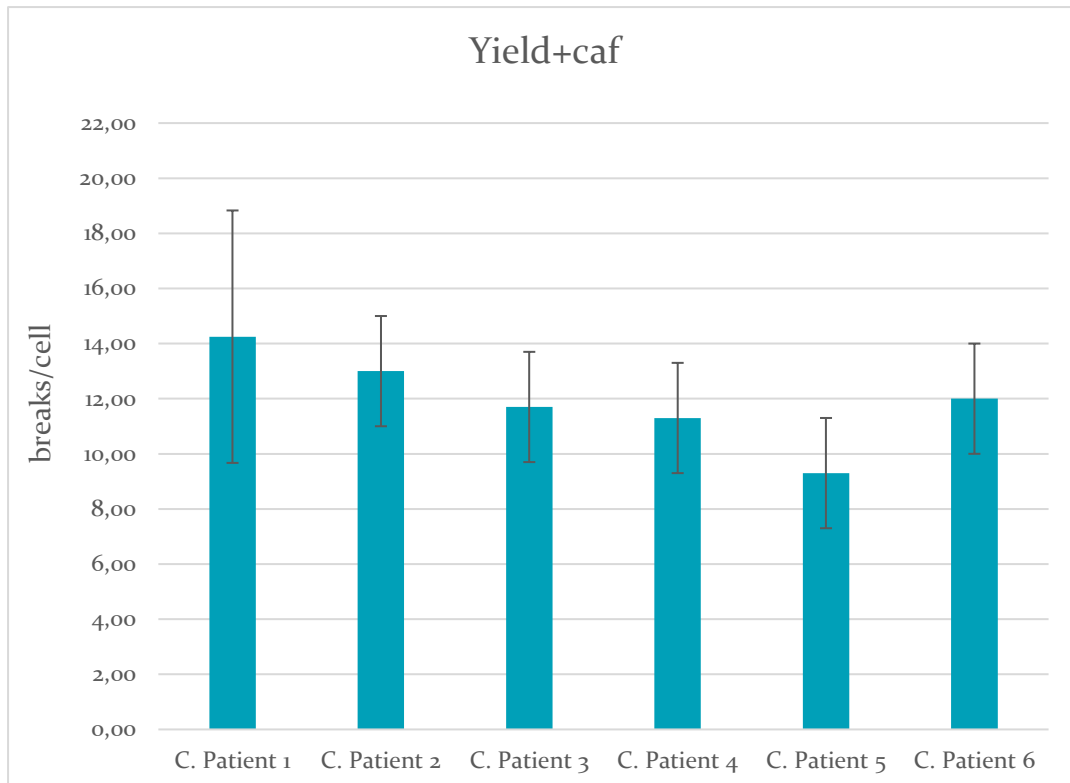
Πίνακας 7.2.2 Συνοπτικός πίνακας μέσων όρων θραυσμάτων ανά κύτταρο και Ατομικού δείκτη Ακτινοευαισθησίας (IRS) για ασθενείς με νέοπλασίες, σύμφωνα με τον οποίο κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα που θα ακολουθήσουν.

	Cancer Patient 1	Cancer Patient 2	Cancer Patient 3	Cancer Patient 4	Cancer Patient 5	Cancer Patient 6
Yield	8,13	8	7,7	5,6	5	6
Yield (+caf)	14,25	13	11,7	11,3	9,3	12
Yield (+hyp)	17,28	-	-	-	-	-
IRS <sub>caf</sub>	57,32	61,54	65,81	49,56	53,76	50
IRS <sub>hyp</sub>	47,15	-	-	-	-	-

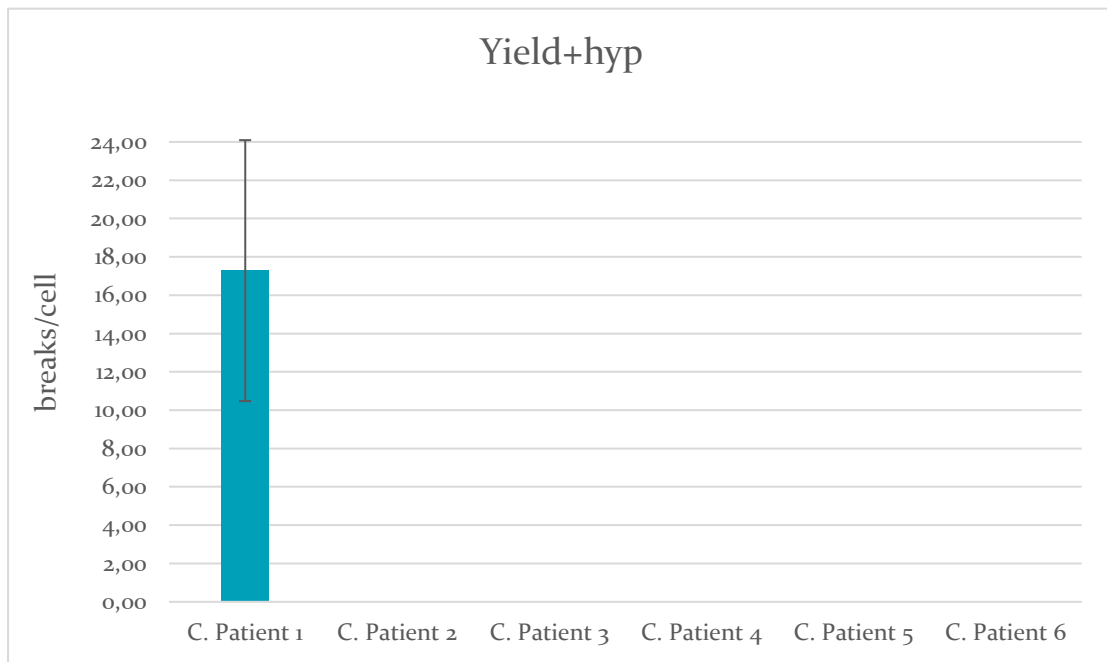
Έγιναν τα συγκεντρωτικά διαγράμματα απλών ακτινοβολημένων δειγμάτων, ακτινοβολημένων δειγμάτων με προσθήκη καφεΐνης και ακτινοβολημένων δειγμάτων που υπεβλήθησαν σε υπερθερμία, για όλους τους καρκινοπαθείς ασθενείς, στα οποία σημειώνεται και ο Ατομικός Δείκτης Ακτινοευαισθησίας (IRS), όπως αυτός υπολογίστηκε, ώστε να μπορεί να γίνει σύγκριση μεταξύ ατόμων του πληθυσμού.



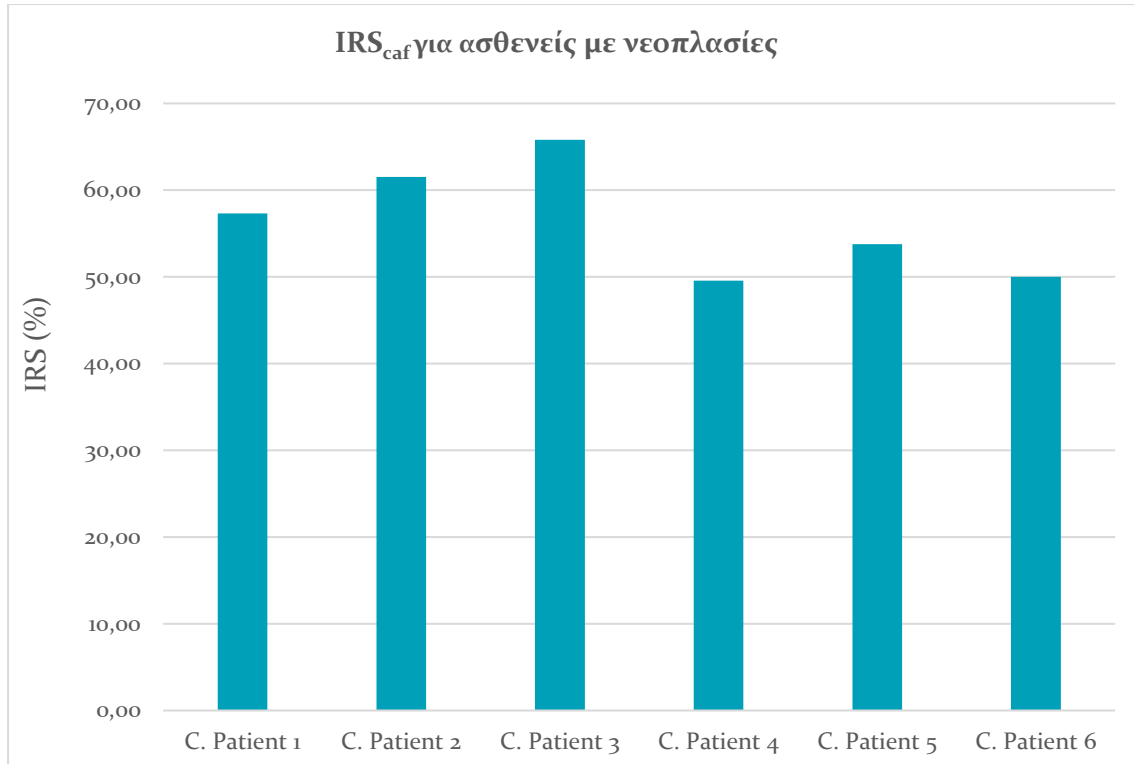
Γράφημα 7.2.5 Γραφική αναπαράσταση μέσου όρου θραυσμάτων ανά κύτταρο για κάθε καρκινοπαθή ασθενή.



Γράφημα 7.2.6 Γραφική αναπαράσταση μέσου όρου θραυσμάτων ανά κύτταρο για κάθε καρκινοπαθή ασθενή σε καλλιέργειες με προσθήκη καφεΐνης.

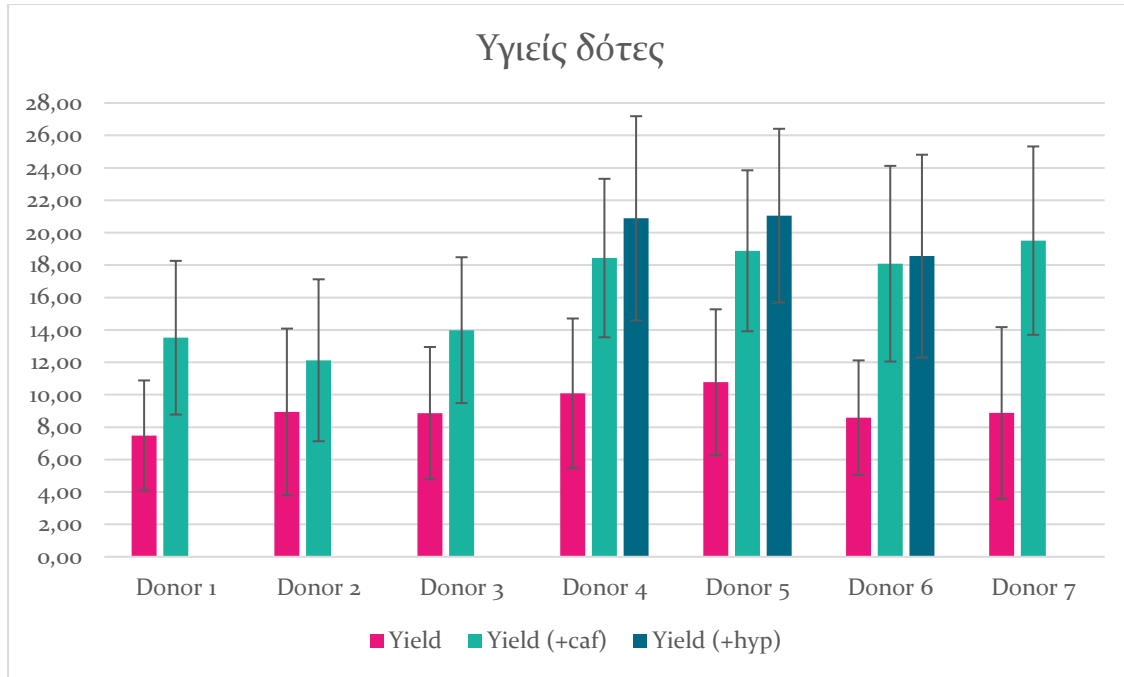


Γράφημα 7.2.7 Γραφική αναπαράσταση μέσου όρου θραυσμάτων ανά κύτταρο για κάθε καρκινοπαθή ασθενή σε καλλιέργειες που έχουν υποβληθεί σε υπερθερμία.

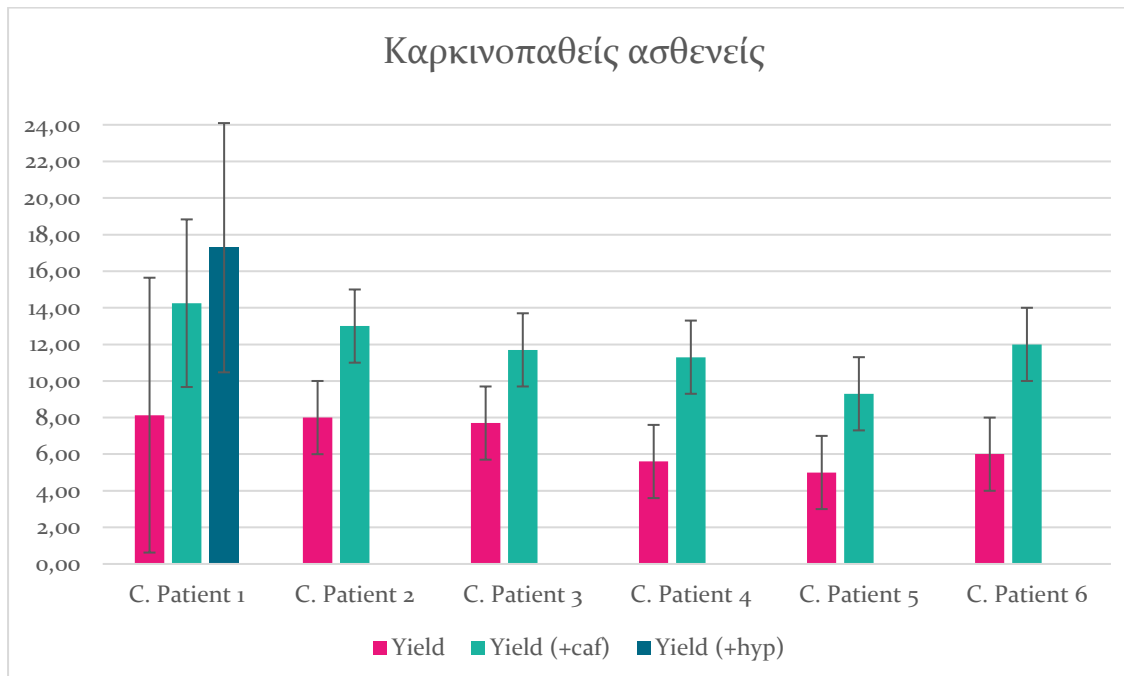


Γράφημα 7.2.8 Διακύμανση ατομικής ακτινοευαισθησίας ασθενών με νεοπλασίες.

Τέλος, παρουσιάζονται δύο διαγράμματα, ένα για τους ασθενείς με προδιάθεση στην καρκινογένεση και υγιών ατόμων κι ένα για τους ασθενείς με νεοπλασίες, στα οποία παρατίθενται όλα τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα με σκοπό τη διεξαγωγή συμπερασμάτων.



Γράφημα 7.2.9 Στο διάγραμμα αναπαρίστανται τα δεδομένα για κάθε υγιή δότη (μέσος όρος θραυσμάτων ανά κύτταρο σε απλό ακτινοβολημένο δείγμα, σε ακτινοβολημένο δείγμα με καφεΐνη και σε ακτινοβολημένο δείγμα που υποβλήθηκε σε υπερθερμία, αλλά και τα ποσοστά για το IRS).



Γράφημα 7.2.10 Στο διάγραμμα αναπαρίστανται τα δεδομένα για κάθε ασθενή (μέσος όρος θραυσμάτων ανά κύτταρο σε απλό ακτινοβολημένο δείγμα, σε ακτινοβολημένο δείγμα με καφεΐνη και σε ακτινοβολημένο δείγμα που υποβλήθηκε σε υπερθερμία, αλλά και τα ποσοστά για το IRS).



Μετά την ανάλυση των δειγμάτων, συγκρίναμε την αναστολή του σημείου ελέγχου ένα πρώτο συμπέρασμα στο οποίο καταλήξαμε είναι πως η υπερθερμία αποδείχθηκε αποτελεσματικότερος αναστολέας του σημείου ελέγχου G<sub>2</sub>/M σε σχέση με την καφεΐνη. Παρατηρώντας τα διαγράμματα θραυσμάτων χρωματίδης ανά κύτταρο για ακτινοβολημένα δείγματα με προσθήκη καφεΐνης και για ακτινοβολημένα δείγματα που υποβλήθησαν σε υπερθερμία, βλέπουμε πως η συχνότητα θραυσμάτων σε αυτά που έχουν υποβληθεί σε υπερθερμία εμφανίζει αύξηση σε σχέση με αυτά στα οποία προστέθηκε καφεΐνη. Επιπλέον, αυξημένη G<sub>2</sub>-χρωμοσωμική ακτινοευαισθησία σε ασθενείς με νεοπλασματικές ασθένειες καθώς και σε ασθενείς με σύνδρομο ευαισθησίας στον καρκίνο παρατηρείται χρησιμοποιώντας καφεΐνη και υπερθερμία ως καταργητές G<sub>2</sub>/M-checkpoint.

## 7.3 Έλεγχος ακτινοευαισθησίας

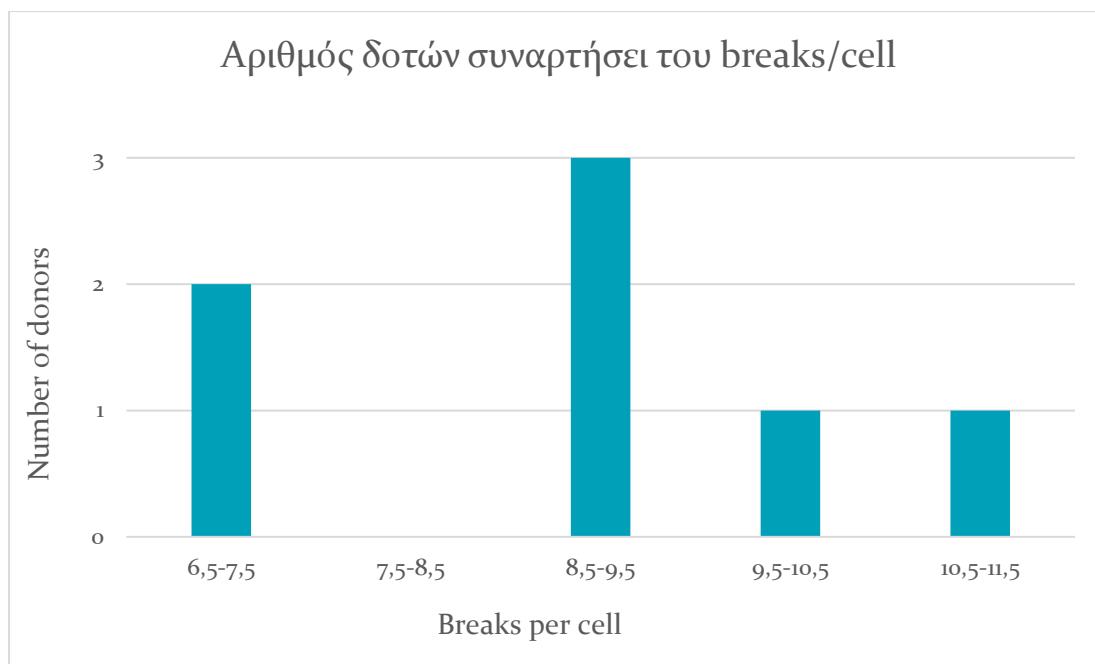
Έχει μεγάλη σημασία να ελεγχθεί κατά πόσο η μέθοδος της G2 χρωμοσωμικής ανάλυσης επιτρέπει την εκτίμηση της χρωμοσωμικής ευαισθησίας, ώστε να είναι δόκιμο να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση ενδογενούς ακτινοευαισθησίας μεμονωμένων ατόμων, όπως ασθενών προς υποβολή σε ακτινοθεραπεία, επαγγελματίες που εκτίθενται σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες στο χώρο εργασίας τους κτλ. Γι' αυτό και σε πρώτο στάδιο μετρήθηκε η χρωμοσωμική ακτινοευαισθησία λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος σε υγιείς δότες και μετά σε καρκινοπαθείς.

### 7.3.1 Εκτίμηση χρωμοσωμικής ακτινοευαισθησίας μεταξύ υγιών ατόμων

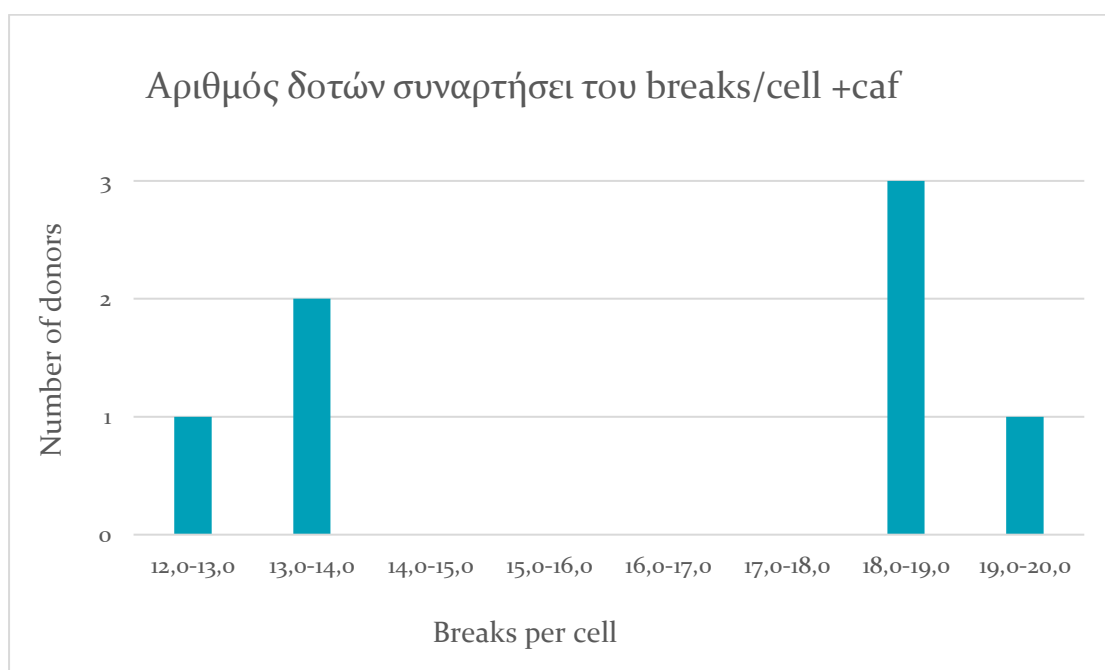
Μετρήθηκε η χρωμοσωμική ακτινοευαισθησία σε επτά υγιείς δότες. Η μέτρηση έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο της “G2 χρωμοσωμικής ακτινοευαισθησίας”, όπως αυτή έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο. Ακολουθεί πίνακας αποτελεσμάτων με αριθμό θραυσμάτων ανά κύτταρο (θ/κ) για κάθε δότη χωρίς χημειοευαισθητοποιητή, με καφεΐνη και με υπερθερμία.

Πίνακας 7.3.1

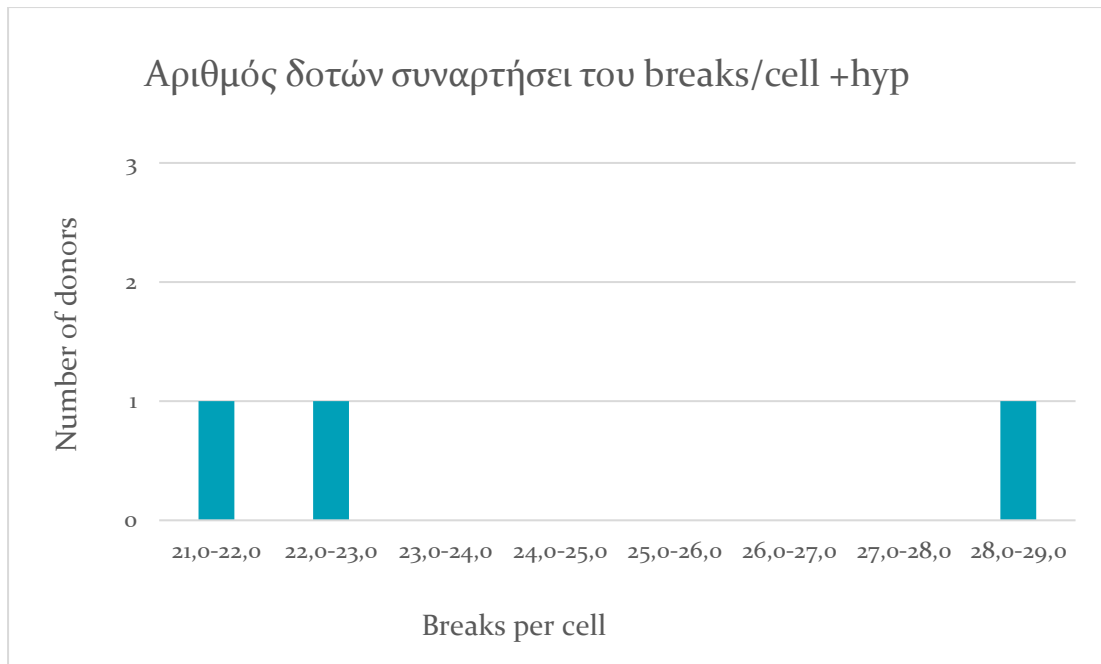
Δότης	θ/κ	θ/κ +caf	θ/κ +hyp
Donor 1	7,49	13,37	-
Donor 2	6,62	12,13	-
Donor 3	8,87	13,98	-
Donor 4	9,79	18,44	22,39
Donor 5	10,77	18,88	21,05
Donor 6	8,59	18,09	28,21
Donor 7	8,88	19,51	-
M.O.	8,72	16,34	23,88



Γράφημα 7.3.1.1 Γραφική αναπαράσταση αριθμού υγιών δοτών συναρτήσει του αριθμού θραυσμάτων ανά κύτταρο.



Γράφημα 7.3.1.2 Γραφική αναπαράσταση αριθμού υγιών δοτών συναρτήσει του αριθμού θραυσμάτων ανά κύτταρο σε καλλιέργειες με προσθήκη καφεΐνης.



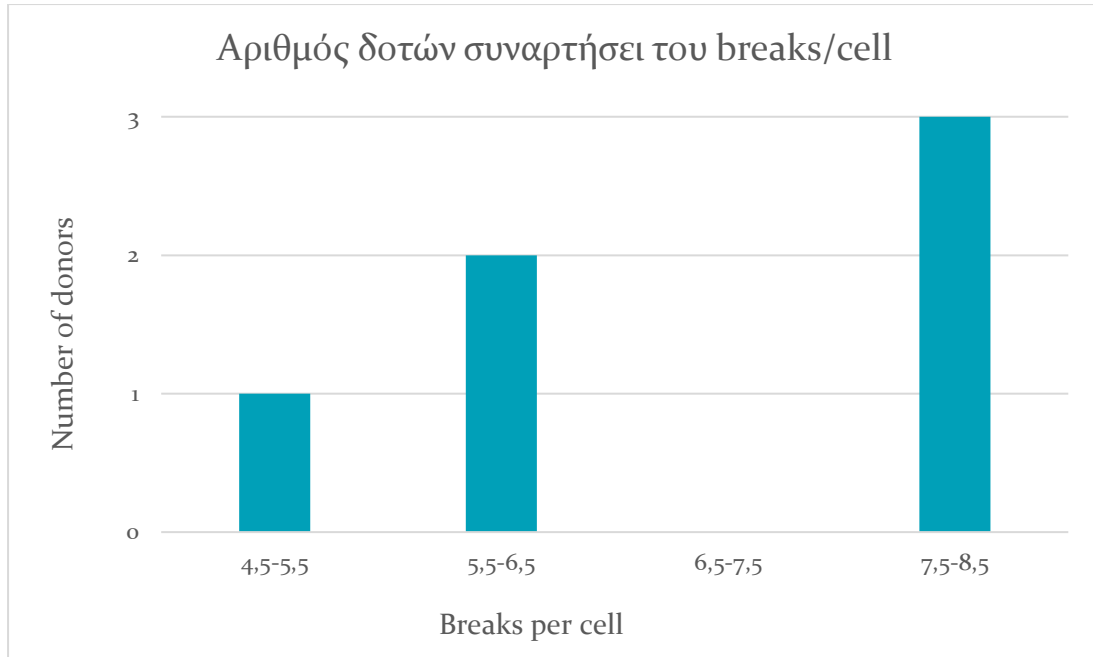
Γράφημα 7.3.1.3 Γραφική αναπαράσταση αριθμού υγιών δοτών συναρτήσει του αριθμού θραυσμάτων ανά κύτταρο σε καλλιέργεια που έχει υποβληθεί σε υπερθερμία.

### 7.3.2 Εκτίμηση χρωμοσωμικής ακτινοευαισθησίας καρκινοπαθών δοτών

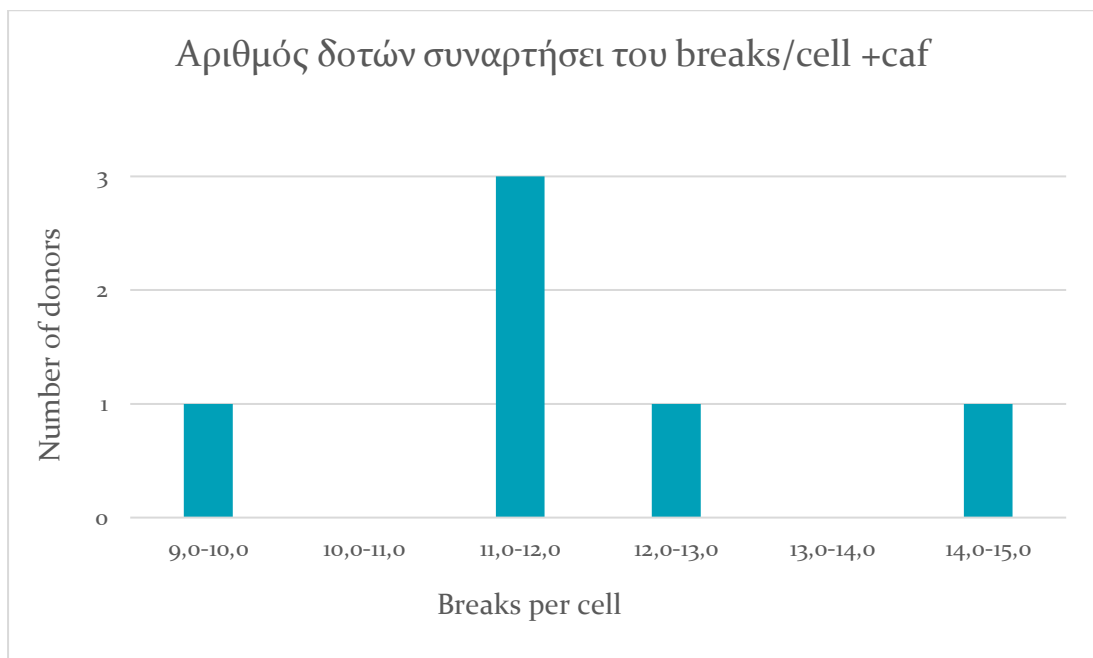
Μετρήθηκε η χρωμοσωμική ευαισθησία σε έξι ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται για κάθε ασθενή ο αριθμός θραυσμάτων ανά κύτταρο (θ/κ).

Πίνακας 7.3.2

Δότης	θ/κ	θ/κ +caf	θ/κ +hyp
Cancer Patient 1	6.00	12.00	-
Cancer Patient 2	5.00	9.30	-
Cancer Patient 3	5.60	11.30	-
Cancer Patient 4	7.70	11.70	-
Cancer Patient 5	8.00	13.00	-
Cancer Patient 6	8.14	14.25	17.29
M.O.	6,74	11,93	17,29



Γράφημα 7.3.2.1 Γραφική αναπαράσταση αριθμού καρκινοπαθών δοτών συναρτήσει του αριθμού θραυσμάτων ανά κύτταρο.



Γράφημα 7.3.2.2 Γραφική αναπαράσταση αριθμού καρκινοπαθών δοτών συναρτήσει του αριθμού θραυσμάτων ανά κύτταρο σε καλλιέργειες με προσθήκη καφεΐνης.

Δεν παρατίθεται διάγραμμα για αριθμό δοτών συναρτήσει του breaks/cell +hyp, επειδή ο αριθμός δειγμάτων είναι πολύ μικρός για να γίνει στατιστική μελέτη.

## 7.4 Η στατιστική ανάλυση

Αναλόγως με το ποσοστό που προκύπτει για τον Ατομικό Δείκτη Ακτινοευαισθησίας (IRS), μπορούμε να κατατάσσουμε τα άτομα σε κατηγορίες ως προς την ακτινοευαισθησία τους ως ακτινοάντοχα, φυσιολογικά, ακτινοευαίσθητα ή πολύ ακτινοευαίσθητα, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. <sup>[2]</sup>

Radioresistant	IRS<30%
Normal	30%<IRS<50%
Radiosensitive	50%<IRS<70%
High radiosensitive	IRS>70%

Με βάση τον πίνακα αυτόν θα κατατάξουμε τους υγιείς και καρκινοπαθείς ασθενείς που μελετήθηκαν στη διπλωματική αυτή σε συγκεντρωτικό πίνακα, ώστε να καταλήξουμε σε χαρακτηρισμό για τον καθένα.

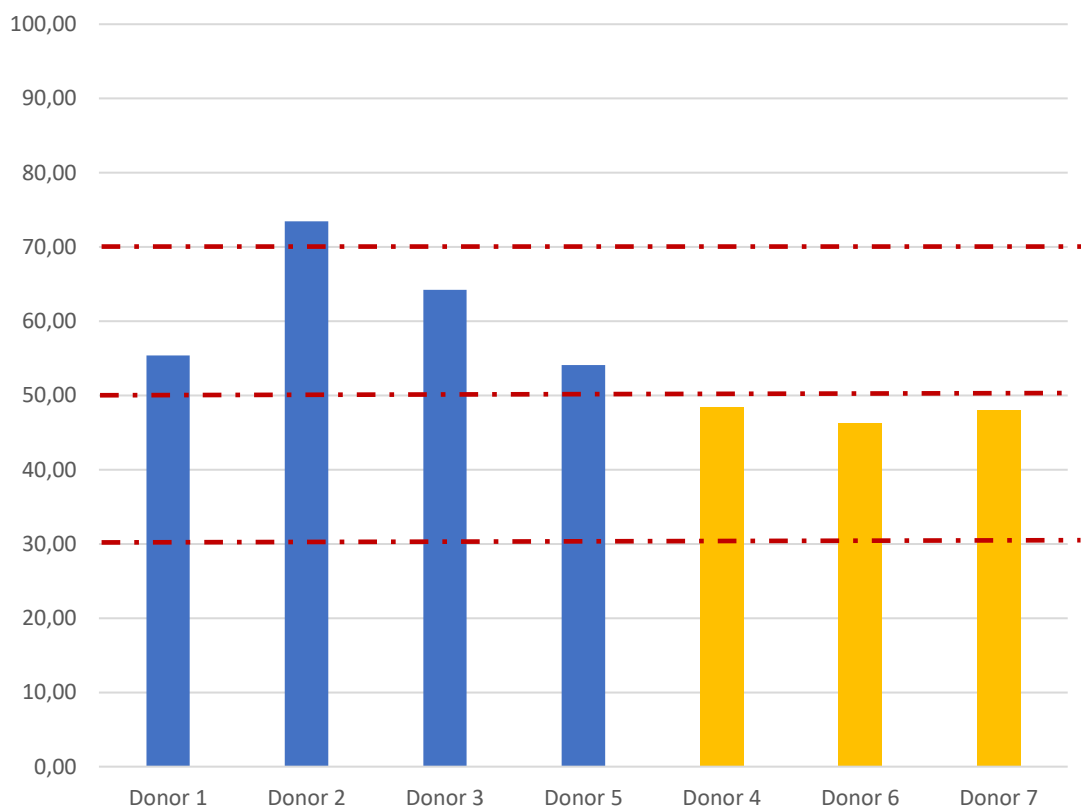
Πίνακας 7.4.1. Υγιείς δότες

%	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 4	Donor 5	Donor 6	Donor 7
IRS <sub>caf</sub>	55,41	73,45	64,24	53,16	57,02	47,67	47,98
IRS <sub>hyp</sub>	-	-	-	43,74	51,16	44,86	-

Πίνακας 7.4.2. Χαρακτηρισμός δοτών

Δότης	IRS <sub>caf</sub> (%)	IRS <sub>hyp</sub> (%)	Χαρακτηρισμός
Donor 1	55,4	-	Ακτινοευαίσθητος
Donor 2	73,45	-	Πολύ Ακτινοευαίσθητος
Donor 3	64,24	-	Ακτινοευαίσθητος
Donor 4	53,16	43,74	Φυσιολογικός
Donor 5	57,02	51,16	Ακτινοευαίσθητος
Donor 6	47,67	44,86	Φυσιολογικός
Donor 7	45,77	-	Φυσιολογικός

### IRS υγιών δοτών και δοτών με σύνδρομο προδιάθεσης στην καρκινογένεση



Γράφημα 7.4.1 Γραφική αναπαράσταση Ατομικού Δείκτη Ακτινοευαισθησίας για τους δότες 1, 2, 3, 5 που είναι υγιείς με σύνδρομο που σχετίζονται με την εμφάνιση καρκινογένεσης και τους δότες 4, 6, 7 που είναι υγιείς.

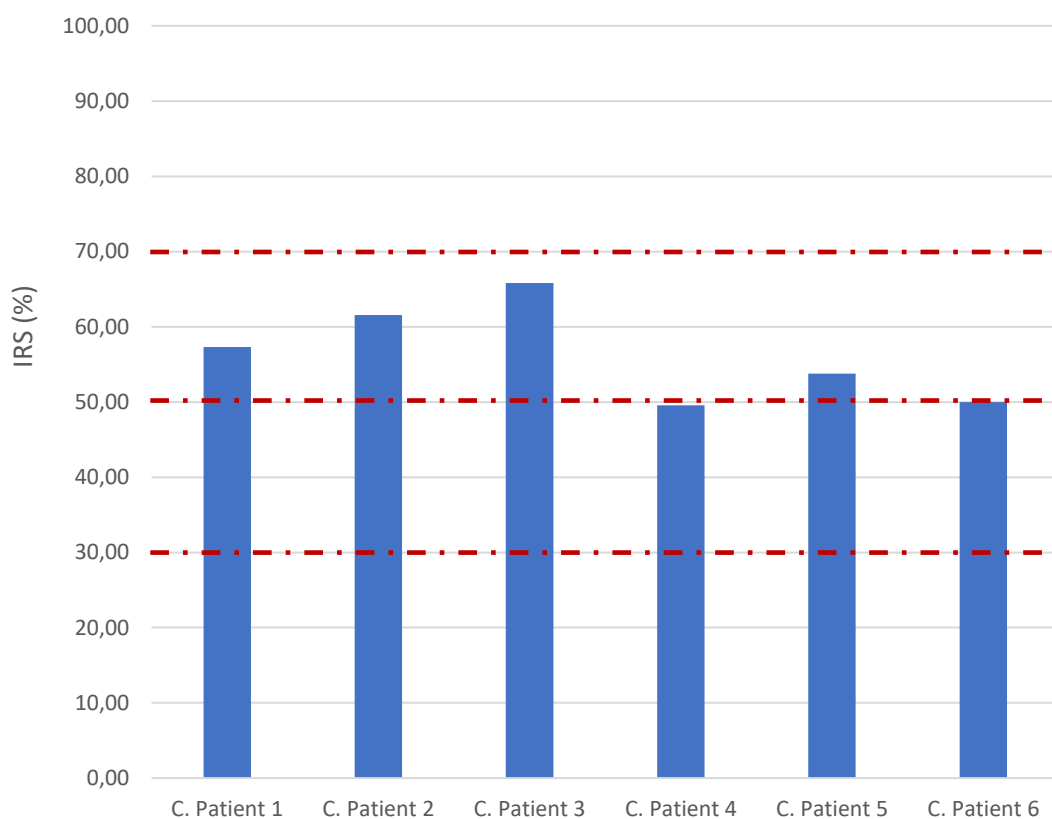
Πίνακας 7.4.3. Καρκινοπαθείς δότες

%	Cancer Patient 1	Cancer Patient 2	Cancer Patient 3	Cancer Patient 4	Cancer Patient 5	Cancer Patient 6
IRS <sub>caf</sub>	57,32	61,54	65,81	49,56	53,76	50
IRS <sub>hyp</sub>	47,15	-	-	-	-	-

Πίνακας 7.4.4. Χαρακτηρισμός καρκινοπαθών δοτών

Δότης	IRS <sub>caf</sub> (%)	IRS <sub>hyp</sub> (%)	Χαρακτηρισμός
Cancer Patient 1	57,32	47,15	Ακτινοευαίσθητος
Cancer Patient 2	61,54	-	Ακτινοευαίσθητος
Cancer Patient 3	65,81	-	Ακτινοευαίσθητος
Cancer Patient 4	49,56	-	Φυσιολογικός
Cancer Patient 5	53,76	-	Ακτινοευαίσθητος
Cancer Patient 6	50,00	-	Φυσιολογικός

## IRS ασθενών με νεοπλασίες



Γράφημα 7.4.2 Γραφική αναπαράσταση Ατομικού Δείκτη Ακτινοευαισθησίας για τους καρκινοπαθείς δότες.



## 8. Συζήτηση

Σε κυτταρικό επίπεδο έχουν παρατηρηθεί διαφορές στην ακτινοευαισθησία μεταξύ των διαφορετικών φάσεων του κυτταρικού κύκλου, μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών συστημάτων και ενδεχομένως να υπάρχουν διαφορές στην ακτινοευαισθησία ακόμη και μεταξύ των διαφορετικών ατόμων.

Με τον έλεγχο της G2 χρωμοσωμικής ακτινοεθαισθησίας φαίνεται η ισχύς της παραπάνω παραδοχής. Η μεθοδολογία αυτή έχει ικανοποιητική ευαισθησία, ώστε να διακρίνει διαφορές μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών με νεοπλασματικά νοσήματα ως προς τη μετατροπή των DNA αλλοιώσεων στη G2 φάση των λεμφοκυττάρων τους σε ορατές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις στη μετάφαση. Μια από τις ενδείξεις της εν γένει ακτινοευαισθησίας ενός ατόμου αποτελεί η μη αποτελεσματική επεξεργασία των βλαβών που επάγονται στο DNA μετά από ακτινοβόληση στη G2 φάση που αξιολογείται με τις εναπομένουσες χρωματιδικές αλλοιώσεις στη μετάφαση.

Η ανάγκη ανίχνευσης αυξημένης ακτινοευαισθησίας εμφανίζεται όχι μόνο σε περιπτώσεις ατυχημάτων ή έκθεσης λόγω επαγγέλματος, αλλά και στην καθημερινή πρακτική της Ακτινοθεραπείας. Έχουν αναφερθεί περιστατικά, όπως αυτό ενός δεκατετράχρονου αγοριού με ασθένεια Hodgkins, το οποίο υπεβλήθη σε ακτινοθεραπεία με το σύνθημα πρωτόκολλο για την ασθένεια αυτή, δεδομένου του ότι ο γιατρός δεν είχε ενδείξεις ότι ο ασθενής ανήκει σε κάποιο σύνδρομο γνωστό για την ακτινοευαισθησία που παρουσιάζει. Ο ασθενής απεβίωσε οκτώ μήνες μετά, εξαιτίας της ακτινοβόλησης. Ασθενής με οξεία λεμφογενή λευχαιμία απεβίωσε, επίσης μετά από ακτινοθεραπεία και εκ' των υστέρων οι δραματικές επιπτώσεις της ακτινοβόλησης αποδόθηκαν στην ανικανότητα των επιδιορθωτικών μηχανισμών των κυττάρων του να αντιμετωπίσουν αλλοιώσεις επαγόμενες από την ακτινοβολία στο DNA. Καθοριστικό παράγοντα της αντίδρασης του φυσιολογικού ιστού των εκτεθειμένων ατόμων αποτελεί η ενδογενής ακτινοευαισθησία των κυττάρων του. Η επίγνωση, επομένως, της ακτινοευαισθησίας των ασθενών αυτών ίσως είχε αποτρέψει το θάνατό τους μετά τη θεραπεία με έκθεση σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες.

Στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε κατά πόσο η χρωμοσωμική ακτινοευαισθησία των ασθενών ήταν αυξημένη σε σχέση με αυτή των υγιών δοτών. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αυξημένη ακτινοευαισθησία σε κλινικό επίπεδο χαρακτηρίζεται με αυξημένη προδιάθεση στην καρκινογένεση και συνδέεται με αυξημένη χρωμοσωμική ακτινοευαισθησία στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει ότι η αυξημένη χρωμοσωμική ακτινοευαισθησία πιθανώς θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη υπερευαισθησίας στην ακτινοβολία και την εμφάνιση ακτινικών αντιδράσεων σε

κλινικό επίπεδο, καθώς τα δείγματα των ασθενών με νεοπλασίες που εξετάσαμε παρουσίασαν ακτινικές αντιδράσεις μετά την ολοκλήρωση των θεραπειών.

Η βλάβη που θα υποστεί ένα άτομο που εκτέθηκε σε ιοντίζουσα ακτινοβολία εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, μερικοί εκ των οποίων είναι η δόση που έλαβε, αν η έκθεση ήταν εντοπισμένη ή σε όλο το σώμα, αν ελήφθη καταταμημένη ή σε δόσεις.

Η εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης και της επικινδυνότητας μιας υπερέκθεσης σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες γίνεται συνήθως μέσω πρότυπων καμπυλών αναφοράς και με την προϋπόθεση ότι μια συγκεκριμένη δόση ακτινοβολίας έχει τα ίδια αποτελέσματα σε όλα τα μέλη του πληθυσμού. Με την εξέταση όμως 7 υγιών και 6 καρκινοπαθών ασθενών, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει διακύμανση στις χρωμοσωμικές αλλοιώσεις μεταξύ των ατόμων, άρα κατά συνέπεια και στην ακτινοευαισθησία τους. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε έχει ικανοποιητική ευαισθησία και είναι αρκετά γρήγορη. Είναι φανερό ότι σε περιπτώσεις ατυχημάτων με ιοντίζουσες ακτινοβολίες η διαπίστωση αυξημένης ακτινοευαισθησίας του εκτεθειμένου συμβάλλει ριζικά στην εξατομίκευση της επικινδυνότητας του ατυχήματος για το συγκεκριμένο άτομο.

Η προτεινόμενη μεθοδολογία G<sub>2</sub> χρωμοσωμικού ελέγχου για την ανίχνευση αυξημένης ακτινοευαισθησίας στο πλαίσιο αξιολόγησης μιας υπερέκθεσης, είναι δυνατόν να συμβάλλει ουσιαστικά και στην γενική ακτινοπροστασία του πληθυσμού. Η έγκαιρη ανίχνευση υπερευαίσθητων μελών του πληθυσμού θεωρείται αποφασιστικής σημασίας για τις Υπηρεσίες Ακτινοπροστασίας, ώστε να αποφευχθεί η επαγγελματική ενασχόληση και έκθεση των ατόμων αυτών στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες.

Επίσης, συμπεραίνουμε πως η υπερθερμία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως αναστολέας για τον υπολογισμό του δείκτη ατομικής ακτινοευαισθησίας στο G<sub>2</sub>-assay με μεγάλη αποτελεσματικότητα. Η χρήση των αναστολέων G<sub>2</sub>/M-checkpoint για τη μελέτη των μηχανισμών που αποτελούν τη βάση της ατομικής ακτινοευαισθησίας καθώς και της αντοχής του όγκου θα μπορούσε να ανοίξει το δρόμο για την ανάπτυξη προηγμένων τεχνικών ακτινοθεραπείας για τη βελτίωση του θεραπευτικού αποτελέσματος.

Χρησιμοποιώντας και καφεΐνη και υπερθερμία ως καταργητές του G<sub>2</sub>/M σημείου ελέγχου, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως οι καταργητές θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα μέσο υπέρβασης της αντίστασης του όγκου στην ακτινοβολία. Επίσης η χρήση των αναστολέων του G<sub>2</sub>/M σημείου ελέγχου για τη μελέτη της ακτινοευαισθησίας ιστού καθώς και την αντίσταση του όγκου θα μπορούσαν να αποτελέσουν βάση μελέτης για νέες προσεγγίσεις στην ακτινοθεραπεία ώστε να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα της θεραπείας των ασθενών. Επιπλέον, η διαπίστωση πως η υπερθερμία είναι ισχυρός αναστολέας του G<sub>2</sub>/M, άρα προκαλεί

ευαισθησία στον ιστό στον οποίο έχει εφαρμοστεί, μας ανοίγει ως πεδίο έρευνας κι εφαρμογής της αξιοποίησής της για αποτελεσματικότερη θεραπεία με ακτινοβολία.

Καταλήγουμε, λοιπόν, ότι είτε σε περίπτωση έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία λόγω ατυχήματος, λόγω τυχαίας έκθεσης ή θεραπείας είναι πάρα πολύ μεγάλης σημασίας για την πιθανότητα και την ποιότητα επιβίωσης του ατόμου που μελετάται η γνώση της ακτινοευαισθησίας που εμφανίζει, ώστε να γίνει από πλευράς γιατρών κατάλληλος προγραμματισμός θεραπειών. Γι' αυτό και είναι αναγκαία η συνεχής προσπάθεια εύρεσης νέων πιο γρήγορων μεθόδων και με μεγαλύτερη ακρίβεια για τον προσδιορισμό της ενδογενούς ακτινοευαισθησίας.

Τέλος, η γνώση της ακτινοευαισθησίας κάθε ατόμου μπορεί να συνεισφέρει ουσιαστικά στην:

- ✓ Επιβεβαίωση και αξιολόγηση της επικινδυνότητας ενός ατυχήματος με ιοντίζουσες ακτινοβολίες
- ✓ Έγκαιρη λήψη μέτρων ακτινοπροστασίας για την αντιμετώπιση των άμεσων βιολογικών επιπτώσεων
- ✓ Αναθεώρηση των μέγιστων επιτρεπτών ορίων έκθεσης
- ✓ Εξατομίκευση των πρωτοκόλλων ακτινοθεραπείας.

Η έγκαιρη ανίχνευση ατόμων του πληθυσμού με γενετική προδιάθεση στην ακτινοευαισθησία και ενδεχομένως στην καρκινογένεση θα συμβάλλει στην προστασία του πληθυσμού και των επαγγελματικά ασχολούμενων με ιοντίζουσες ακτινοβολίες και θα αποτελέσει ένα σημαντικό βήμα στην αναβάθμιση της ακτινοθεραπείας. Η κλινική εφαρμογή μιας ευαίσθητης και αξιόπιστης μεθοδολογίας για την εκτίμηση του βαθμού εξατομικευμένης ακτινοευαισθησίας των ασθενών θα δώσει τη δυνατότητα αφ' ενός αύξησης της απορροφούμενης δόσης και συνεπώς αποτελεσματικότερης θεραπείας και αφ' ετέρου μείωσης των σοβαρών επιπλοκών που ορισμένες φορές ακολουθούν την ακτινοθεραπεία.

## 9. Βιβλιογραφία

1. *A new cytogenetic approach for the evaluation of mutagenic potential of chemicals that induce cell cycle arrest in the G<sub>2</sub> phase.*, Terzoudi GI, Malik SI, Pantelias GE, Margaritis K, Manola K, Makropoulos W., *Mutagenesis*. 2003 Nov.
2. *A standardized G<sub>2</sub>-assay for the prediction of individual radiosensitivity.* Pantelias GE, Terzoudi GI, *Radiother Oncol*. 2011 Epub 2011 Oct 18.
3. *Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment*, Technical report series no.260, IAEA, Vienna
4. *Caffeine impairs resection during DNA break repair by reducing the levels of nucleases Sae2 and Dna2.*, Tsabar M, Eapen VV, Mason JM, Memisoglu G, Waterman DP, Long MJ, Bishop DK, Haber JE., *Nucleic Acids Res*. 2015 Vol 43, No. 14,. Online published on 2015 May 27.
5. *Checkpoint abrogation in G<sub>2</sub> compromises repair of chromosomal breaks in ataxia telangiectasia cells.*, Terzoudi GI, Manola KN, Pantelias GE, Iliakis G., *Cancer Res*. 2005 Dec
6. *Chromosomal radiosensitivity: a study of the chromosomal G<sub>2</sub> assay in human blood lymphocytes indicating significant inter-individual variability*, V. Martt, G. B. Curwen, C. A. Whitehouse, A. Edwards and E. J. Tawn, *International commission on Radiobiological Protection: Publication 60, The 1990 recommendations for the International Commission on Radiological Protection*, ICRP 1990
7. *Complex DNA Damage: A Route to Radiation-Induced Genomic Instability and Carcinogenesis*, Ifigeneia V. Mavragani, Zacharenia Nikitaki, Maria P. Souli, Asef Aziz, Somaira Nowsheen, Khaled Aziz, Emmy Rogakou and Alexandros G. Georgakilas, *Cancers* 2017
8. *Cytogenetic effects of radiotherapy breakpoint distribution in induced chromosome aberrations*, Leonardo Barrios, Rosa Miró, Maria Rosa Caballín, Carme Fuster, Ferràn Guedea, Antoni Subias, Josep Egozcue, *Cancer Genetics and Cytogenetics Volume 41, Issue 1, August 1989*
9. *Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualisation after exposure to ionising radiation.*, Terzoudi GI, Pantelias GE, *Radiat Prot Dosimetry*. 2006
10. *DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice*, Agnes Schipler and George Iliakis, *Nucleic Acids Res*. 2013 Sep
11. *DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization painting of all chromosomes of a human female karyotype.*, Barquinero JF1, Knehr S, Braselmann H, Figel M, Bauchinger M., *Int J Radiat Biol*. 1998 Sep
12. *Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all*, Arlene L. Oei, Lianne E. M. Vriend, Johannes Crezee, Nicolaas A. P. Franken and Przemek M. Krawczyk, *Radiation Oncology* 7 August 2015
13. *Effects of Radiation Quality and Oxygen on Clustered DNA Lesions and Cell Death*, Robert D. Stewart, Victor K. Yu, Alexandros G. Georgakilas, Constantinos Koumenis, Joo Han Park and David J. Carlson, *Radiation Research* 2011

14. *Effects of radical scavengers on radiation-induced DNA double strand breaks*, K. S. Haveles, A. G. Georgakilas, E. G. Sideris, V. Sophianopoulou, *int. J. Radiat. Biol* 2000, vol. 76, no. 1, 51- 59
15. *Hyperthermia exposure induces apoptosis and inhibits proliferation in HCT116 cells by upregulating miR-34a and causing transcriptional activation of p53*, Zan Luo, Kangxia Zheng, Qi Fan, Xinyao Jiang, and Dehai Xiong
16. *International commission on Radiobiological Protection: Publication 85, Avoidance of radiation injuries from medical interventional procedures*, ICRP 2001
17. *International commission on Radiobiological Protection: Publication 103, The 2007 recommendations for the International Commission on Radiological Protection*, ICRP 2007
18. *Mechanisms of DNA damage repair in adult stem cells and implications for cancer formation*, Clare E. WeedenMarie-Liesse, Asselin-Labat, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Volume 1864, Issue 1, January 2018, Pages 89-101
19. *Molecular determinants of radiosensitivity in normal and tumor tissue: A bioinformatic approach* Athanasia Pavlopoulou, Pantelis G. Bagos, Vasiliki Koutsandrea, Alexandros G. Georgakilas, *Cancer Letters* 403, 2017
20. *Radiation-induced Chromosome Aberrations Analysed by Fluorescence in Situ Hybridization with a Triple Combination of Composite Whole Chromosome-specific DNA Probes*, E. Schmid, H. Zitzelsberger, H. Braselmann, J.W. Gray & M. Bauchinger, *Int. J. Radiat. Biol.* 2003
21. *Sources, effects and risks of ionizing radiation*, UNSCEAR 2017 Report
22. *Structure-activity relationships for G2 checkpoint inhibition by caffeine analogs*, Xiuxian Jiang, Lynette Y. Lim, John W. Daly, An Hu Li, Kenneth A. Jacobson, and Michel Roberge, *Int J Oncol.* 2000 May.
23. *Systemic DNA Damage Related to Cancer* Olga A. Martin<sup>1</sup>, Christophe E. Redon<sup>1</sup>, Asako J. Nakamura<sup>1</sup>, Jennifer S. Dickey, Alexandros G. Georgakilas, and William M. Bonner, *Cancer Research*, May 15 2011
24. *The physics of radiology*, H. E. Johns, J. R. Cunningham, 1983
25. *The relationship between cellular radiation sensitivity and tissue response may provide the basis for individualising radiotherapy schedules.*, Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH., *Radiotherapy and Oncology* 1994 Dec.
26. *The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry.*, Pantelias GE, Maillie HD., *Radiat Res.* 1984 Jul.
27. *X-ray-induced chromatid damage in relation to DNA repair and cancer incidence in family members.*, Knight RD<sup>1</sup>, Parshad R, Price FM, Tarone RE, Sanford KK., *Int J Cancer.* 1993 Jun
28. *Ακτινοβιολογία – Ακτινοθεραπεία Ακτινοπροστασία, Ενότητα 2: Δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στο κύτταρο*, Δ.Καρδαμάκης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής Πατρών
29. *Ανίχνευση σύνθετων βλαβών DNA σε καρκινικά και υγιή κύτταρα έπειτα από έκθεση σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας γ*, ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ, Μαγγέλης Αναστάσιος, Φυσικός Εφαρμογών, ΕΜΠ
30. *Βιοδοσιμετρία ιοντιζουσών ακτινοβολιών και μελέτη ακτινοευαισθησίας με κυτταρογενετικές μεθόδους και μοριακούς ανιχνευτές*, Διδακτορική διατριβή, Γεωργία Ι. Τερζούδη, 1998

31. Βιολογικά αποτελέσματα της έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία, Π. Δημητρίου, Π. Παπαγιάννης
32. Διαλέξεις μαθήματος Βιοφυσικής, Αλ. Γεωργακίλας, ΣΕΜΦΕ
33. Εκτίμηση επικινδυνότητας ιοντιζουσών ακτινοβολιών με μεθόδους κυτταρογενετικής, Πέτσα Δήμητρα, ΕΜΠ, Αθήνα 2008
34. Επικινδυνότητα ιοντιζουσών ακτινοβολιών και εκτίμηση ενδογενούς ακτινοευαισθησίας με βάση την επαγωγή χρωματιδικών θραυσμάτων στη G2-φάση λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος, Καραχρήστου Ιωάννα, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Αθήνα 2008
35. Θέματα Μοριακής Βιοφυσικής, Σ. Χαμόδρακας, 1987
36. Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες-Εφαρμογές στην Ιατρική και τη Βιολογία, Ε. Γαζής, ΕΜΠ 2002
37. Ιατρική Φυσική, Π. Ψαρράκος, 2005
38. Ιατρική Φυσική, Τζαφλίδου Μ., Gutenberg 2010
39. Κβαντομηχανική Ι, Τραχανάς Στ., ΠΕΚ-ΙΤΕ, 2014
40. Κβαντομηχανική ΙΙ, Τραχανάς Στ., ΠΕΚ-ΙΤΕ, 2013
41. Κυτταρογενετικός έλεγχος έκθεσης και υπερευαισθησίας στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες, Παντελιάς Γ., Τερζούδη Γ., Εργαστήριο Υγιοφυσικής & Περιβαλλοντικής Υγιεινής ΙΠΤ-Α, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»
42. Ο κυτταρικός κύκλος, Κεφάλαιο 9, Γ. Ρήγας, Α. Αθανασίου
43. Ποιοτικός έλεγχος συστήματος μικροκυματικής υπερθερμίας με διορθωτική κεραία 433 MHz, Νικολακοπούλου Αγγελική, ΕΚΠΑ, Αθήνα 2015